

Fotolitička razgradnja albendazola u okolišu

Badrov, Alan

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:985909>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Alan Badrov

FOTOLITIČKA RAZGRADNJA ALBENDAZOLA U OKOLIŠU

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Sandra Babić
2. izv. prof. dr. sc. Irena Škorić
3. dr. sc. Mirta Čizmić

Zagreb, srpanj 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu uz financijsku potporu Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-2353 „Sudbina farmaceutika u okolišu i tijekom naprednih postupaka obrade vode“



Pri izradi ovog rada stekao sam nova teoretska i praktična znanja, te bih se htio zahvaliti svim osobama koje su bile dio toga.

Prije svega htio bih se zahvaliti svojoj obitelji, prijateljima i mojoj zaručnici Josipi koji su mi bili velika podrška u mom studiju. Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić koja mi je svojim vodstvom, iskustvom, savjetima i znanjem mnogo pomogla tijekom izrade diplomskog rada.

Velika hvala mag. chem. Dariu Dabiću na velikoj raspoloživosti i razumijevanju, te brojnim savjetima koji su mi pomogli u eksperimentalnom dijelu rada.

Zahvaljujem se dipl. ing. Mislavu Runje, koji mi je izašao u susret i omogućio da provodim analize u Plivi i dipl. ing. Korneliji Lasić koja je uložila puno vremena i volje prilikom analiziranja uzoraka.

Posebno bih se zahvalio tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić na velikoj pomoći pri provođenju eksperimentalnog dijela rada.

Sažetak

U ovom radu istražena je fotolitička razgradnja albendazola djelovanjem umjetnog Sunčevog zračenja. Osim izravne, istražena je i neizravna razgradnja ispitivanjem utjecaja huminskih kiselina (1, 5 i 10 mg L⁻¹), nitrata (1 i 3 mg L⁻¹), karbonata (80 i 420 mg L⁻¹) te utjecaj pH-vrijednosti (5, 7 i 9).

Dobiveni rezultati pokazali su da je u svim eksperimentima došlo do smanjenja koncentracije albendazola na manje od 40 % početne vrijednosti unutar prvih 15 minuta sunčanja. Otopina huminskih kiselina koncentracije 10 mg L⁻¹ ima najveći utjecaj na povećanje vremena poluraspada albendazola, dok je vrijeme poluraspada bilo najkraće u otopini koncentracije 5 mg L⁻¹. Nitrati nisu imali značajan utjecaj na fotolitičku razgradnju albendazola, dok se u otopini karbonata vrijeme poluraspada povećalo. Kod ispitivanja utjecaja pH vrijednosti, pokazalo se da je vrijeme poluraspada najveće pri pH vrijednosti 5, a najmanje pri pH vrijednosti 7.

Najveće smanjenje početne koncentracije albendazola uočeno je u otopini huminskih kiselina koncentracije 5 mg L⁻¹, a koncentracija albendazola na kraju eksperimenta iznosila je 9,87 % početne vrijednosti. Najmanje smanjenje izmjereno je u puferskoj otopini pH vrijednosti 7 s koncentracijom albendazola 41,53 % početne vrijednosti.

Rezultati analiza su pokazali da izravna fotolitička razgradnja albendazola može biti značajan put smanjenja njegove koncentracije u okolišu. Važno je napomenuti da niti u jednom eksperimentu nije došlo do potpune razgradnje albendazola.

Ključne riječi: farmaceutici, antihelmintici, albendazol, fotolitička razgradnja, kinetika razgradnje, UHPLC/MS-QTOF

Abstract

In this work photolytic degradation of albendazole was investigated under simulated Solar radiation. Beside direct, indirect photolytic degradation was investigated in different solutions: MilliQ water, humic acids (1, 5 and 10 mg L⁻¹), nitrates solutions (1 and 3 mg L⁻¹), carbonates solutions (80 and 420 mg L⁻¹) and buffer solutions with pH-values of 5, 7 and 9.

Results of photolytic degradation show that the concentration of albendazole was reduced more than 40 % in the first 15 minutes of radiation. The biggest increase of half-life of albendazole was observed in solution of humic acids with concentration of 10 mg L⁻¹ while the 5 mg L⁻¹ solution had the biggest effect on the decline of half-life. Compared to MilliQ water, in the presence of nitrates no significant effect on photolytic degradation of albendazole was observed. For carbonates, increase of half-life of albendazole was determined. Investigating the effect of buffer solutions on the half-life of albendazole different effects were observed; the buffer with the pH value 5 increased half-life while the buffer with the pH value 7 reduced half-life of photolytic degradation of albendazole.

The biggest reduction of albendazole concentration was determined in the 5 mg L⁻¹ solution of humic acids, at the end of experiments albendazole concentration was 9,87 % of the starting value. The lowest reduction of concentration was detected in the buffer solution with the pH value 7, the final concentration was 41,53 % of the starting value.

The results have shown that direct photolysis of albendazole can be a significant elimination process for albendazole in the environment. It is a major process in its degradation. In all experiments, complete degradation of albendazole was not obtained.

Key words: pharmaceuticals, antihelmintics, albendazole, photolytic degradation, UHPLC/MS-QTOF

KAZALO

1. Uvod	1
2. Opći dio	2
2.1. Nova zagađivala	2
2.2. Farmaceutici	4
2.3. Razgradnja farmaceutika u okolišu	5
2.4. Fotolitička razgradnja farmaceutika	5
2.5. Antihelmintici	7
2.6. Albendazol	7
2.7. Detekcija i prisutnost farmaceutika u okolišu	11
2.8. Kromatografija	11
2.9. Analiza farmaceutika u okolišu	15
2.10. Spregnuta spektrometrija masa (MS^n)	22
3. Eksperimentalni dio	24
3.1. Materijali	24
3.1.2. Kemikalije	24
3.1.3. Albendazol	25
3.2. Instrumenti	26
3.2.1 pH-metar	26
3.2.2. Elektronička analitička vaga	27
3.2.3. Suntest CPS+	28
3.2.4. Spektrofotometar	29
3.2.5. Tekućinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa (UHPLC/MS-QTOF)	30
3.3. Metoda rada	31
3.3.1. Priprema otopine albendazola u MilliQ vodi	31
3.3.2. Priprema otopina albendazola uz dodatak huminskih kiselina	31

3.3.3. Priprema otopina albendazola uz dodatak nitrata	32
3.3.4. Priprema otopina albendazola različitih pH-vrijednosti.....	32
3.3.5. Priprema otopina albendazola uz dodatak bikarbonata.....	33
3.3.6. Osvjetljavanje otopina albendazola.....	33
3.3.7. Analiza na QTOF-UHPLC/MS-u.....	34
4. Rezultati i rasprava.....	35
4.1. Izravna fotolitička razgradnja albendazol	35
4.1. Neizravna fotolitička razgradnja albendazola	36
4.1.1. Utjecaj pH-vrijednosti	36
4.1.2. Utjecaj huminskih kiselina	37
4.1.3. Utjecaj nitrata	39
4.1.4. Utjecaj karbonata.....	40
5. Zaključci.....	42
6. Literatura	43

1. Uvod

Tijekom 20. stoljeća razvoj farmaceutskih proizvoda je znatno napredovao što je rezultiralo povećanom kvalitetom medicinske i veterinarske skrbi. U zadnja 3 desetljeća u više preglednih radova je istaknuta učestala detekcija farmaceutika u okolišu. Na temelju monitoringa farmaceutika u EU, SAD-u i Kini su istaknuli da se farmaceutici učestalo pojavljuju u okolišu. Najčešće u površinskim vodama i to u koncentracijama između 0,1 i 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Do danas je detektirano ukupno 600 različitih farmaceutika u okolišu što je uzrokovalo zabrinutost zbog potencijalnog štetnog, direktnog i indirektnog utjecaja na zdravlje ljudi i okoliš.

Farmaceutici se ubrajaju tzv. „nova zagađivala“ što znači da su zbog potencijalno štetnog utjecaja na okoliš privukli pažnju javnosti. Zbog kompleksnosti okolišnih uvjeta i malih koncentracija (ng L^{-1}) u kojima se pojavljuju u okoliš teško je predvidjeti njihov utjecaj na okoliš. Potrebno je za svaki farmaceutik provoditi istraživanja. Trenutno je najviše istraživanja usmjereno prema istraživanju antibiotika u okolišu, zbog opasnosti koju predstavlja razvoj rezistentnosti kod bakterija. Trenutno je 70 % bakterijskih sojeva neosjetljivo na barem jedan antibiotik.

Farmaceutici koji se koriste za tretiranje infekcija izazvanih helminticima zovu se antihelmintici. Helmintici su najrašireniji u tropskim i subtropskim područjima, a najviše u državama supsaharske Afrike, Južne Amerike i Istočne Azije. Procjenjuje se da je oko 1,5 milijarda ljudi zaražena helminticima. Još uvijek nije sasvim poznat utjecaj antihelmintika na okoliš, no zabilježena je pojava rezistentnosti prema svim grupama antihelmintika.

Fotolitička razgradnja može biti značajan proces smanjenja koncentracije farmaceutika u okolišu. Jedan od najčešće korištenih antihelmintika je benzimidazol albendazol. U ovom radu je istraživana fotolitička razgradnja albendazola u prisutnosti različitih kemijskih tvari koje se uobičajeno nalaze u vodenom okolišu s ciljem simuliranja uvjeta u kojima se albendazol nalazi nakon što dospije u okoliš.

2. Opći dio

2.1. Nova zagađivala

Pojam „Nova zagađivala“ se odnosi na skupinu kemijskih spojeva kojima se do nedavno nije pridavalo značenje kao zagađivalima, a koji se sve više ispuštaju u okoliš u količinama koje bi mogle predstavljati potencijalnu opasnost za ekosustav, te za koje ne postoji zakonska regulativa o ispuštanju u okoliš [1]. To može biti bilo koji prirodni ili sintetički kemijski spoj, odnosno mikroorganizam nad kojim ne postoji monitoring. Njihova prisutnost može uzrokovati negativne posljedice na okoliš i ljudsko zdravlje. Neki od njih prisutni su u okolišu već duže vrijeme kao što su pesticidi, a mogu biti i novi kemijski spojevi kao što su farmaceutici. Zbog velikog broja različitih spojeva koji pripadaju ovoj skupini, kategorizirani su prema prirodi, svrsi, načinu upotrebe i drugim karakteristikama. Osnovne kategorije su farmaceutici, proizvodi za osobnu njegu, plastifikatori, pesticidi, surfaktanti i sintetički hormoni [2]. U tablici 1. su prikazane neke kategorije novih zagađivala.

Kemijsko svojstvo velikog broja novih zagađivala je njihova kemijska stabilnost što ih čini otpornima prema razgradnji u okolišnim uvjetima, zbog čega se neki spojevi kontinuirano akumuliraju u okolišu. Postrojenja za obradu industrijskih i komunalnih otpadnih voda ih mogu samo djelomično ukloniti, ali mogu uzrokovati i razgradnju određenih spojeva na stabilnije i toksičnije spojeve koji potom dospijevaju u okoliš [2].

Farmaceutici su razvijeni da izazivaju biološke učinke pri vrlo niskim koncentracijama. Dovoljni su i tragovi za nepoželjno djelovanje na ljude i organizme koji žive u vodama. Prva znanstvena upozorenja o farmaceutskom zagađenju voda objavljena su početkom devedesetih godina prošlog stoljeća kad su znanstvenici otkrili masovnu pojavu feminiziranih riba mužjaka i to u područjima rijeka koje se nalaze nizvodno od postrojenja za obradu otpadnih voda. Osim estrogenskih spojeva, pronađeni su i mnogi drugi koji imaju nepovoljan utjecaj na okoliš. Zbog toga se velik broj znanstvenih istraživanja fokusira na utjecaj farmaceutika na okoliš i ljudsko zdravlje [2].

Tablica 1. Kategorije novih zagađivala, okoliš u kojem su detektirani i pretpostavljeni utjecaj na okoliš [2]

Kategorija	Okoliš u kojem je kategorija detektirana	Pretpostavljeni utjecaj na okoliš
Antibiotici	Podzemne vode, površinske vode, voda za piće, izlazne struje i mulj postrojenja za obradu otpadnih voda	Rezistentnost bakterija prema antibiotiku
Farmaceutici	Podzemne vode, površinske vode, voda za piće, izlazne struje i mulj postrojenja za obradu otpadnih voda	Karcinom, oštećenje organa
Proizvodi za osobnu njegu	Podzemne vode, površinske vode, sedimentima, izlazne struje i mulj postrojenja za obradu otpadnih voda, bioakumulirani u tkivu riba	Rezistentnost bakterija, Poremećaj endokrinog sustava
Pesticidi	Površinske vode, podzemne vode, voda za piće, reciklirana voda	Poremećaj endokrinog sustava
Plastifikatori	Površinske vode	Poremećaj endokrinog sustava, karcinom
Reproduktivni hormoni	Površinske vode, podzemne vode, voda za piće, reciklirana voda	Poremećaj endokrinog sustava

2.2. Farmaceutici

Farmaceutici su složeni organski spojevi koji se u medicini i veterini koriste za liječenje ili ublažavanja simptoma bolesti. Ovoj skupini pripadaju i hormoni koji se koriste kao promotori rasta u agroindustriji. Većinom su to organski spojevi molekulske mase od 200 do 500 daltona koji su umjereno topljivi i lipofilni kako bi bili bioraspoloživi i biološki aktivni [3]. Klasificiraju se prema razini kontrole nad lijekom, načinu dobivanja, mehanizmu djelovanja, biološkom sustavu na koji djeluju i terapijskom učinku. Prema nekim procjenama, u medicini se koristi oko 4000 aktivnih farmaceutskih supstanci čija godišnja proizvodnja iznosi više od 100.000 tona [3].

Životni ciklus svakog farmaceutika započinje njegovom proizvodnjom. Tijekom njegove proizvodnje određeni dio farmaceutika i spojeva koji se koriste pri njegovoj formulaciji završe u okolišu, no glavnina dospije u okoliš nakon primjene u medicini ili veterini. Prije nego što uđu u okoliš, farmaceutici se najprije metaboliziraju u organizmu, pri čemu nastaju metaboliti prve i druge faze. Metaboliti prve faze su često reaktivniji i toksičniji u odnosu na polaznu supstancu, a nastaju njegovom oksidacijom, redukcijom ili hidrolizom. Metaboliti druge faze su uglavnom inertni spojevi [4].

Farmaceutici koji se uzimaju u obliku tablete ili suspenzije izlučuju se putem mokraćne i fekalije u polaznom obliku ili u obliku metabolita, a kad se koriste u obliku kreme ili masti, dio se izlučuje, a dio se ispire u kontaktu s vodom [5].

Konvencionalni uređaji za obradu otpadnih voda su se pokazali neučinkoviti za pročišćavanje farmaceutika iz komunalnih otpadnih voda. Neka istraživanja pokazuju da koncentracija farmaceutika može biti veća u izlaznoj struji u odnosu na ulaznu struju postrojenja za obradu komunalnih otpadnih voda što se može povezati s pretvorbom metabolita u početni spoj [1].

Koncentracija nekog farmaceutika ili njegovih metabolita u okolišu ovisi o njegovoj otpornosti na fotokemijsku i mikrobiološku razgradnju, te afinitetu vezanja na krute tvari. Farmaceutici koji imaju afinitet prema vezanju na krute tvari se akumuliraju u tlu i sedimentima, dok se topljive tvari transportiraju u površinske i podzemne vode. Brzina kojom se ispuštaju u okoliš je veća od brzine njihove razgradnje i transformacije. Pronađeni su u ispustima, površinskim i podzemnim vodama, vodovodnoj vodi, te u tlu. Zbog svoje jake biološke aktivnosti mogu izazvati nepoželjno djelovanje pri vrlo niskim koncentracijama [3]. Većina radova je usredotočena na analizu antibiotika čija prisutnost u vodi izaziva niz

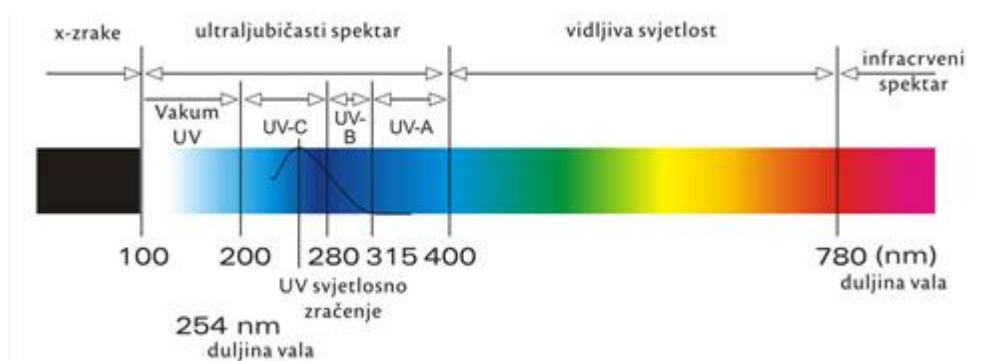
medicinskih i ekoloških problema. Konstantno izlaganje bakterija niskim koncentracijama antibiotika uzrokuje pojavu rezistentnosti prema njihovom farmakološkom djelovanju, zbog čega je više od 70 % bakterijskih sojeva neosjetljivo na barem jedan antibiotik. Drugi veliki problem su kemijske reakcije antibiotika u vodi sa sredstvima za obradu voda. Antibiotici se u reakciji s klorom pregrađuju, te tvore druge kemijske spojeve koji mogu biti toksičniji od početnog farmaceutskog spoja. Antibiotici koji ostanu u svom izvornom obliku nakon kemijske obrade, mogu uzrokovati stvaranje kolonija „superbakterija“ [3].

2.3. Razgradnja farmaceutika u okolišu

Razgradnju farmaceutika u vodi uzrokuju abiotički i biotički procesi. Abiotički procesi razgradnje uključuju hidrolizu, fotolizu te oksidaciju, dok biotička razgradnja podrazumijeva razgradnju farmaceutika bakterijama i gljivicama [1]. Dobar pokazatelj brzine razgradnje farmaceutika u okolišu je vrijeme poluraspada ($t_{1/2}$) koje se definira kao vrijeme potrebno da se koncentracija polazne molekule prepolovi u odnosu na početnu koncentraciju [5].

2.4. Fotolitička razgradnja farmaceutika

Značajan mehanizam razgradnje farmaceutika u okolišu je putem izravne i neizravne fotolize. Farmaceutici sadrže aromatske prstene, π -konjugirane sustave, heteroatome i druge funkcijske kromoforne skupine koje mogu apsorbirati Sunčevo zračenje. Izravna fotoliza farmaceutika je uzrokovana apsorpcijom Sunčevog svjetla. Da bi uopće došlo do fotolitičke razgradnje farmaceutika, njegov apsorpcijski spektar se mora barem dijelom preklapati sa spektrom Sunčeva zračenja [6]. Na slici 1 prikazan je spektar Sunčevog zračenja.

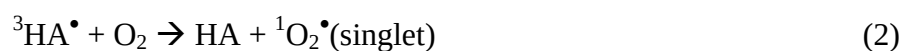


Slika 1. Spektar Sunčevog zračenja [7]

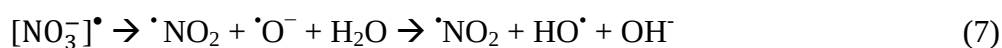
Većina farmaceutika apsorbira svjetlost u nižem području elektromagnetskog zračenja, te je preklapanje apsorpcijskih spektara vrlo malo, no dovoljno da uzrokuje direktnu fotolitičku razgradnju. Osim o apsorpcijskom spektru, učinkovitost direktne fotolize ovisi o kvantnom prinosu (ϕ). Kvantni prinos je omjer potrošenog reaktanta ili dobivenog produkta i

množine apsorbiranih fotona. Vrijednosti se kreću od 0 do 1, a uobičajene vrijednosti kvantnog prinosa farmaceutika kreću se između 0,0001 i 0,1 [1].

U prirodnim vodama su prisutne otopljene huminske kiseline i nitratni ioni. Pod utjecajem Sunčevog zračenja, te tvari mogu generirati jake oksidirajuće vrste kao što su hidroksilni radikali. Huminske kiseline apsorbiraju UV-zračenje u širokom spektru valnih duljina, što uzrokuje sporiju izravnu fotolizu farmaceutika. No, prelaskom u pobuđeno stanje ($^3\text{HA}^\bullet$) molekule huminskih kiselina reagiraju s molekulama farmaceutika, pritom ubrzavajući njihovu razgradnju. Pobuđene huminske kiseline mogu reagirati i s kisikom stvarajući hidroksilne radikale ($\text{HO}^\bullet$), superoksid ($\text{O}_2^\bullet$) i molekule singletnog kisika ($^1\text{O}_2$) [1]:



Nitratni ioni također imaju dvojako djelovanje. Mogu asporbirati Sunčevo zračenje i tada usporavaju fotolitičku razgradnju ili je ubrzavaju stvaranjem hidroksil radikala ($\text{HO}^\bullet$) koji reagiraju s molekulama farmaceutika [1]:



Dok nitratni ioni i huminske kiseline mogu ubrzati fotolitičku razgradnju, hidrogenkarbonatni ioni vežu hidroksilne radikale, pri čemu nastaju manje reaktivni i selektivniji radikali $^\bullet\text{CO}_3^-$ što rezultira sporijom fotolitičkom razgradnjom farmaceutika [1]:



Osim navedenih čimbenika, na brzinu fotolitičke razgradnje utječu koncentracija farmaceutika, pH-vrijednost vode u kojoj se nalazi, dubina vode, geografska širina, godišnje doba, vremenski uvjeti, intenzitet Sunčeva zračenja i temperatura vode [5].

Reakcije neizravne fotolize su jednostavne reakcije, no zbog njihovog velikog broja teško je predvidjeti koji će sve produkti nastati. Razgradnjom farmaceutika mogu nastati stabilniji i toksičniji spojevi u odnosu na polaznu tvar [2].

2.5. Antihelmintici

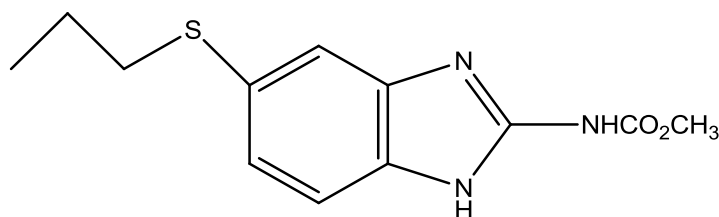
Helmintici su široka skupina parazitskih glisti koja obuhvaća nematode, cestode i trematode, te uzrokuju zdravstvene probleme u mnogim dijelovima svijeta. 24 % svjetske populacije zaraženo je nekom vrstom helminta [8].

Antihelmintici su skupina farmaceutika koji se koriste za uklanjanje parazitskih glisti, trakavica (helminta) i drugih crvolikih crijevnih nametnika na čovjeku i domaćim životinjama. Antihelmintici omamljuju ili ubijaju parazite bez nanošenja značajne štete organizmu domaćina, a sredstva za čišćenje omogućuju crijevnoj peristaltici njihovo uklanjanje iz crijeva. Ne postoji univerzalni antihelmintik koji bi djelovao na sve crijevne nametnike. Kriteriji pri izboru su djelotvornost, spektar djelovanja, podnošljivost i tip helmintijaze. Na temelju kemijske strukture i mehanizmu djelovanja dijele se na benzimidazole, difenilsulfide, imidazo-tiazole, heksahidropirazine, makrocikličke laktone, salicilanilide, tetrahidropirimidine i druge [9].

Još uvijek nije sasvim poznat utjecaj antihelmintika na okoliš, no zabilježena je pojava rezistentnosti prema svim grupama antihelmintika [10], što bi u budućnosti moglo ugroziti agroindustriju diljem svijeta.

2.6. Albendazol

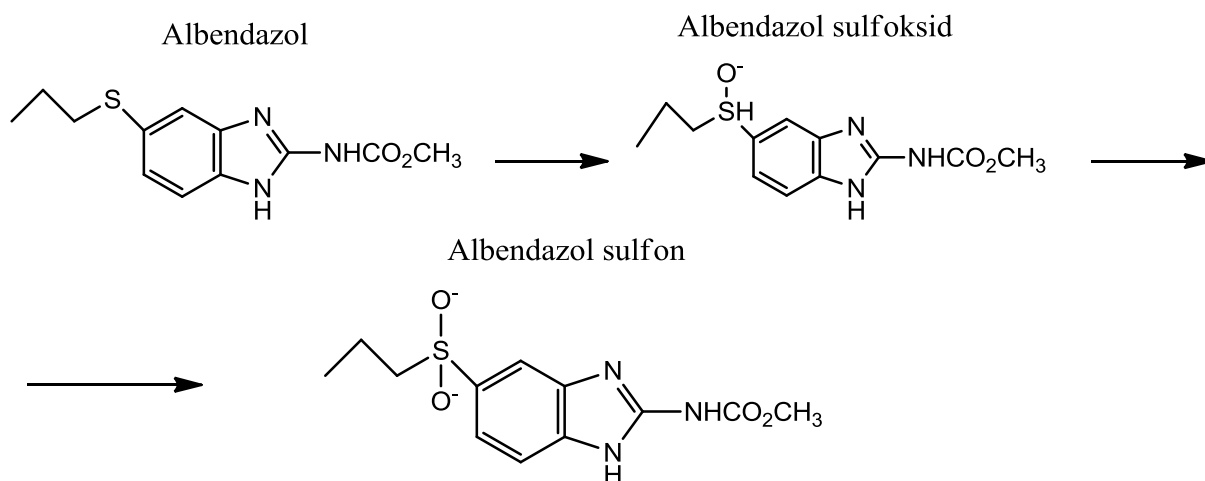
Albendazol (ALB) (Slika 2) pripada skupini benzimidazola i jedan je od najčešće korištenih antihelmintika. Koristi se za liječenje ljudi, domaćih životinja i kućnih ljubimaca. Jedan je od prvih benzimidazola koji su uspješno korišteni u liječenju svih razvojnih stadija gastrointestinalnih nematoda. Djelotvoran je pri liječenju infekcija uzrokovanih crijevnim i plućnim glistama, metiljima i trakavicama. Albendazol, kao i svi benzimidazoli se veže za tubulinske stanice helminta, pri čemu ometa apsorpciju glukoze u stanice što rezultira njihovim izgladnjivanjem i ugibanjem. Svjetska zdravstvena organizacija ga je postavila na listu najpotrebnijih lijekova u zdravstvenom sustavu [11].



Slika 2. Albendazol

ALB je hidrofoban zbog čega se slabo apsorbira u gastrointestinalnom sustavu. Nakon oralne konzumacije, mikrosomatski enzim jetre albendazol monooksigenaza oksidira sulfidnu funkcionalnu skupinu albendazola, te kao rezultat toga nastaje njegov primarni metabolit albendazol sulfoksid (ALBS). ALBS posjeduje antihelmintičku aktivnost, te je djelotvornost albendazola pripisana upravo tom metabolitu [11].

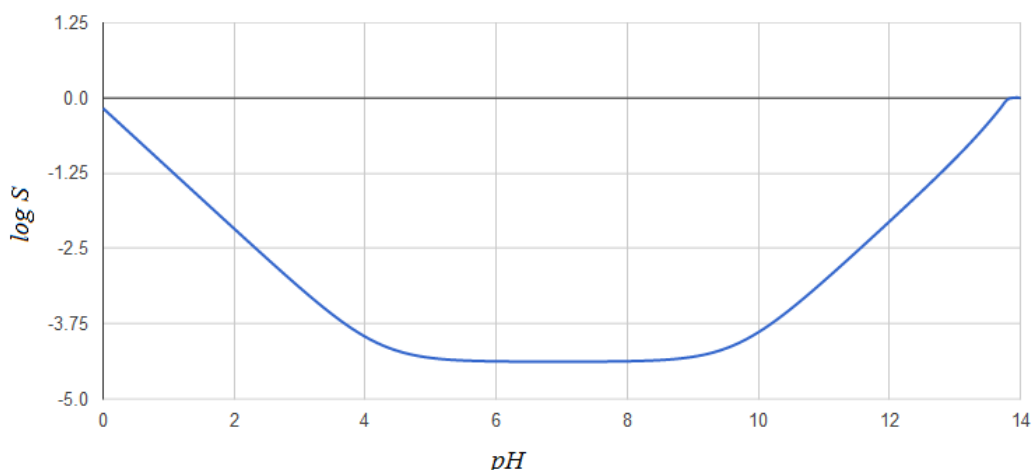
70% ALBS se veže za serumske bjelancevine, te se distribuira kroz cijeli organizam. Pronađen je u urinu, žući, jetri, cerebrospiralnoj tekućini i cistama. ALBS se dalje oksidira u neaktivni albendazol sulfon, te deacetilacijom karbamatne grupe nastaje 2-aminosulfon koji je također neaktivan. Albendazol i njegovi metaboliti (Slika 3) se izlučuju putem izmeta i urina. Kod stoke tretirane radioaktivno obilježenim albendazolom, većina ostataka albendazola je detektirana u jetri, a manjim dijelom u bubrezima. Neaktivni metaboliti albendazola su pronađeni u urinu [12].



Slika 3. Metabolizam albendazola

Albendazol je, kao i svi benzimidazoli, podložan direktnoj fotolizi. Izmjerena vremena poluraspada albendazola otopljenog u vodi, pri pH vrijednosti 5, 7 i 9, pod utjecajem direktne fotolize iznose 10 min, 16 min i 6 minuta, pri ljetnim uvjetima, te 50 min, 80 min, i 20 minuta pri zimskim uvjetima pod utjecajem izravne fotolize [4].

Topljivost albendazola ovisi o pH-vrijednosti okoliša u kojem se nalazi (Slika 4).



Slika 4. Ovisnost topljivosti ALB o pH [13]

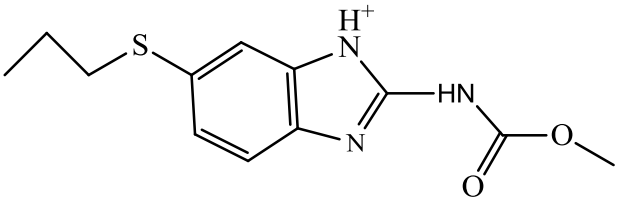
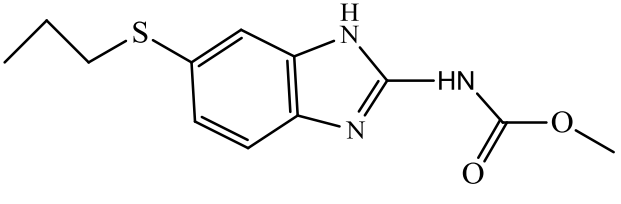
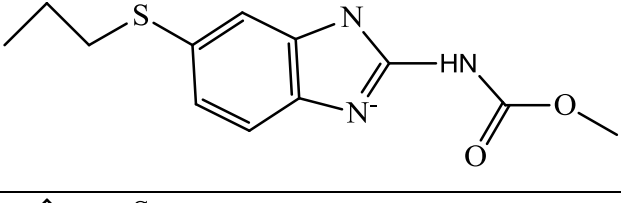
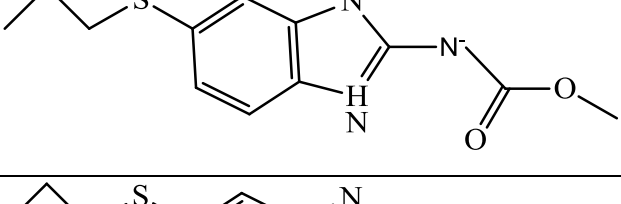
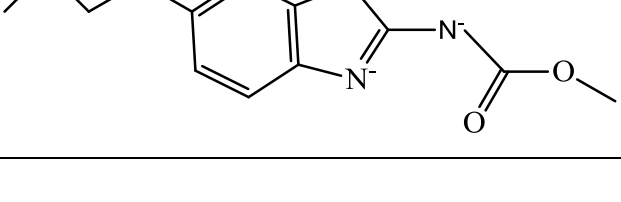
Logaritam konstante ionizacije kiseline (pK_a) iznosi 9,68, dok logaritam konstante ionizacije baze (pK_b) iznosi 4,21. ALB se zbog toga ionizira u pH-području između 0 i 4, te 10 i 14. Na slici 5 prikazan je utjecaj pH-vrijednosti na raspodjelu ioniziranih oblika albendazola.



Slika 5. Ionizacija ALB [13]

U prvom području dolazi do protoniranja zbog čega raste topljivost ALB u vodi. U područjima 3, 4 i 5 se deprotonira. U području 2 je u neutralnom obliku, što znači da je u tom rasponu pH-vrijednosti ALB slabo topljiv u odnosu na ostala područja. To je ujedno i raspon u kojem ALB ulazi u vodeni okoliš. U tablici 2. prikazani su ionizirani oblici ALB.

Tablica 2. Ionizirani oblici albendazola

Područje	Ionizirani oblici ALB
1	
2	
3	
4	
5	

2.7. Detekcija i prisutnost farmaceutika u okolišu

Koncentracije farmaceutika u okolišu su vrlo niske, te su potrebne analitičke metode koje mogu kvantificirati i identificirati vrstu spoja. U zadnjih par desetljeća razvijene su sofisticirane analitičke tehnike koje omogućavaju njihovu detekciju pri sve nižim koncentracijama. Moderne analitičke tehnike, kao što su tekućinska i plinska kromatografija, su omogućile detekciju farmaceutika, čak i pri koncentraciji reda veličine ng/L. Kao rezultat dugogodišnjeg razvoja tih tehnika, danas je moguće utjecati na fizikalna i kemijska svojstva farmaceutika već pri formulaciji, te tako smanjiti utjecaj na okoliš [5].

2.8. Kromatografija

Kromatografija je tehnika razdvajanja čistih tvari u homogenoj smjesi. Izumio ju je Mikhail Cvet kad ju je iskoristio za odjeljivanje biljnih pigmenata klorofila i ksantofila prolaskom kroz staklenu kolonu napunjenu CaCO_3 . Odjeljeni sastojci su se vidjeli kao obojene vrpce u stupcu [14].

Kromatografske metode se dijele na kromatografiju na stupcu i plošnu kromatografiju. Kod prve, nepokretna faza ispunjava usku cijev kroz koju se pokretna faza kreće pod utjecajem tlaka i gravitacije. Kod druge, nepokretna faza je nanešena na ravnu plohu, a pokretna faza prolazi kroz nepokretnu fazu pod utjecajem kapilarnih sila ili gravitacije. Prema prirodi ravnoteže između faza dijele se na razdjelnu, adsorpcijsku, afinitetnu i kromatografiju isključenjem. Prema sustavu pokretna-nepokretna faza dijele se na tekućinsku kromatografiju u kojoj je pokretna faza tekućina, plinsku kromatografiju u kojoj je pokretna faza plin i kromatografiju u superkritičnim uvjetima u kojoj je pokretna faza tekućina pri superkritičnim uvjetima [15].

Tijekom kromatografskog procesa uzorak se nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza, pri čemu se molekule gibaju u smjeru gibanja pokretne faze. Analizirani analit mora biti topljiv u pokretnoj fazi i mora se adsorbirati na nepokretnu fazu. Osim toga, sastojci uzorka moraju imati različit afinitet vezanja za nepokretnu fazu. Afinitet vezanja za nepokretnu fazu izražava se konstantom razdjeljenja (K_r) koja je jednaka omjeru koncentraciji razdijeljene komponente i u nepokretnoj ($c_{S,i}$) i pokretnoj fazi ($c_{M,i}$)

$$K_{r,i} = \frac{c_{S,i}}{c_{M,i}} \quad (1)$$

Zbog razlike između tih vrijednosti, pokretna faza će svaku tvar iz homogene smjese tvari nositi različitom brzinom. U plošnoj kromatografiji, karakteristično ponašanje pojedine

tvori u točno definiranom kromatografskom sustavu izražava se faktorom zadržavanja (R_f) koji je omjer udaljenosti koju prijeđe uzorak i udaljenosti koju prijeđe pokretna faza [15].

$$R_f = \frac{\text{Put koji je prošao analit}}{\text{Put koji je prošla pokretna faza}} \quad (2)$$

U kromatografiji na stupcu, kromatografski sustav se može promatrati kao kolona obujma V u kojoj volumen nepokretne faze iznosi V_s , a volumen pokretne faze V_M [15]. Vrijeme koje komponenta i provede u koloni od trenutka unošenja do njegovog maksimalnog odziva je vrijeme zadržavanja. Ono je specifično za svaku molekulu. Vrijeme koje komponenta i provede u nepokretnoj fazi je prilagođeno vrijeme zadržavanja, $t'_{R,i}$, a vrijeme koje komponenta i provede u pokretnoj fazi je zadržano vrijeme $t_{m,i}$ [15].

$$t_R = t_{m,i} + t'_{R,i} \quad (3)$$

Kvalitativna mjera sposobnosti razdjeljivanja naziva se selektivnost, α , i definira se kao omjer faktora zadržavanja dviju komponenti, pri čemu se u nazivniku uvijek nalazi komponenta koja u nepokretnoj fazi provodi manje vremena [15]:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (4)$$

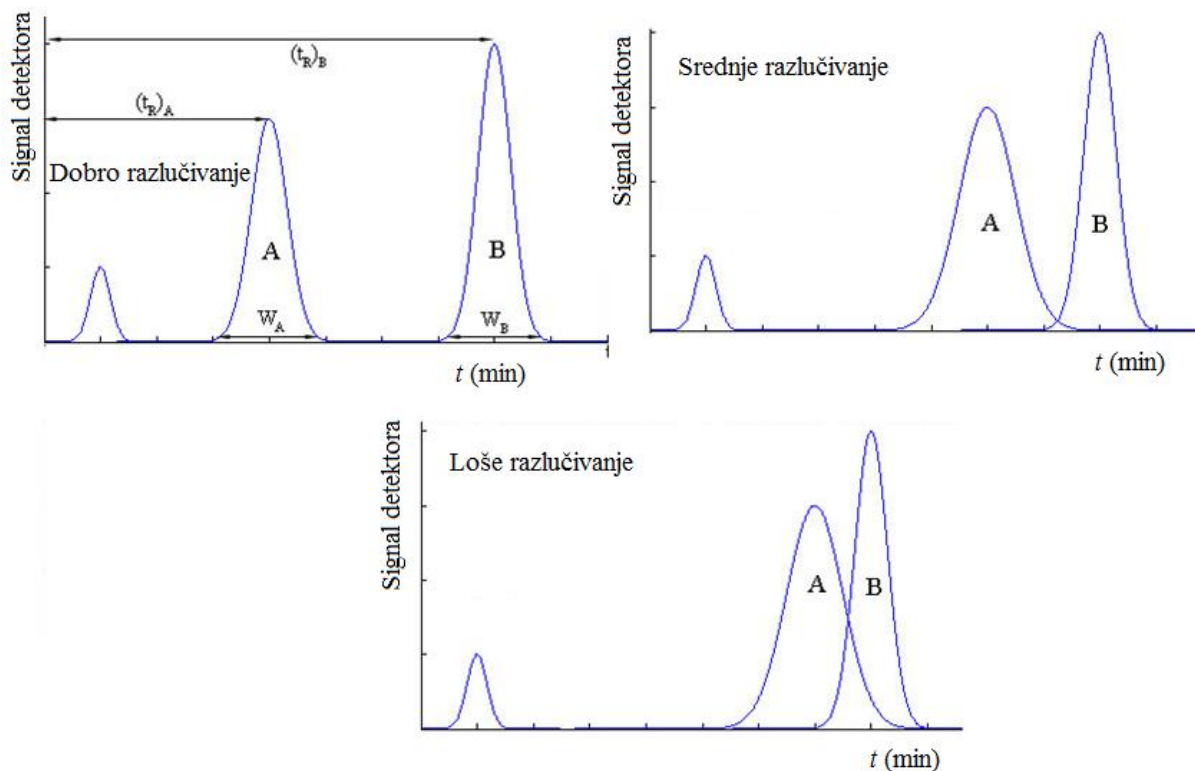
Za razliku od vremena zadržavanja, faktor kapaciteta ne ovisi o brzini protoka i duljini kromatografske kolone, pa je stoga često prikladniji za kvalitativnu karakterizaciju tvari. Poznavanje faktora kapaciteta različitih komponenti dobar je pokazatelj njihovog razdjeljivanja odabranom kromatografskom metodom [15].

$$k_i = \frac{t'_{R,i} - t_m}{t_m} \quad (5)$$

Kromatografsko razlučivanje (R_S) je mjera učinkovitosti odjeljivanja dvaju spojeva. To je sposobnost razlikovanja sličnih odziva detektora [15].

$$R_S = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(w_1 + w_2)} \quad (6)$$

Kako je prikazano na slici 6, što je veće razlučivanje to je jednostavnije razlikovati pikove na kromatogramu.



Slika 6. Razlučivanje kromatografskih pikova [16]

Broj teorijskih tavana predstavlja broj pseudo-ravnoteža ili faznih prijelaza postignutih na određenoj koloni, a zadan je izrazom:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (7)$$

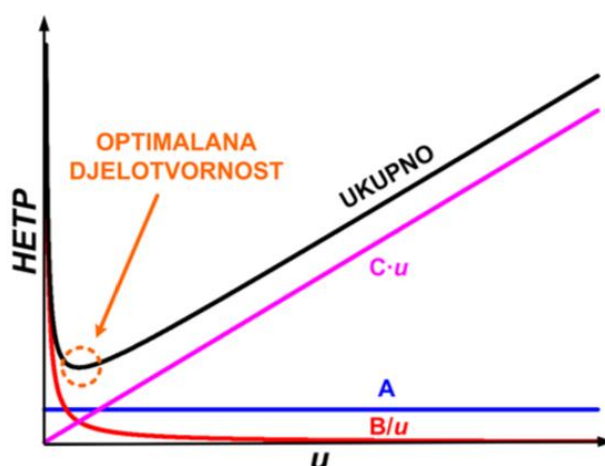
pri čemu je w_b širina pika u osnovici. Djelotvornost kromatografske kolone povećava se povećanjem broja teorijskih tavana.

Tijekom kromatografskog procesa, pokretna faza nosi uzorak uzduž nepokretne faze, pri čemu neprestano dolazi do uspostavljanja ravnotežne raspodjele između faza. Što se više puta uspostavi ravnoteža to je razdvajanje sastojaka djelotvornije. Različite zone koje nastaju razdvajanjem sastojaka se detektiraju, te se potom kvalitativno i kvantitativno analiziraju [15].

Prema teoriji odsječaka, kromatografska kolona sastoji se od niza teoretskih odsječaka. Unutar svakog odsječka dolazi do uspostavljanja dinamičke ravnoteže, pri čemu se analit veže i oslobađa od nepokretne faze nakon čega prelazi u drugi odsječak. Učinkovitost kolone ovisi o broju teoretskih odsječaka, više odsječaka, veća djelotvornost. Van Deemter-ova teorija

brzina upotpunjuje teoriju odsječaka. Naime, teorija odsječaka pretpostavlja postizanje potpune ravnoteže unutar odsječaka, zanemaruje difuziju i brzinu protoka. Prema njoj, visina teoretskog odsječaka (H), pri linearnoj brzini protoka (u) pokretne faze ovisi o kombiniranom djelovanju triju utjecaja (Slika 7). To su vrtložna difuzija (A), uzdužna difuzija (B) i otpor međufaznom prijenosu tvari (C). Van Deemter-ova jednadžba objedinjuje sva tri utjecaja [15]:

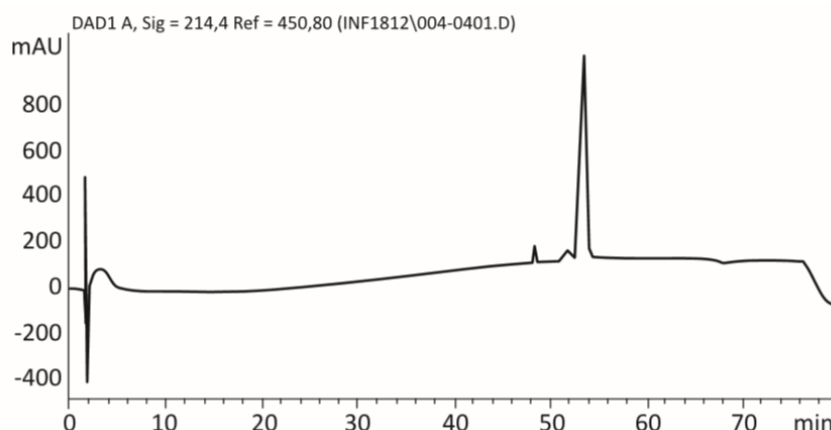
$$H = A + B \times \frac{1}{u} + C \times u \quad 8)$$



Slika 7. Grafički prikaz Van Deemterove jednadžbe [15]

Na slici 7 vidljivo je da se najmanja visina teoretskog odsječaka, a time i najveća kromatografska učinkovitost postiže u točki kada su sumarni uzroci širenju zone (A, B i C) minimalni, te navedena točka određuje optimalni protok mobilne faze. Cilj je pronaći uvjete pri kojima se postiže minimalna visina teoretskog odsječaka i njihov maksimalan broj jer je u tom slučaju djelotvornost kromatografskog razlučivanja najveća [15].

Rezultat kromatografske analize je grafički prikaz odziva detektora u ovisnosti o vremenu eluiranja. Takav grafički prikaz naziva se kromatogram (Slika 8). Pikovi na kromatogramu imaju oblik Gaussove krivulje. Pomoću površine ispod pika može se izračunati količina svakog odijeljenog sastojka, dok položaj pika na vremenskoj osi može poslužiti za identifikaciju uzorka [17].



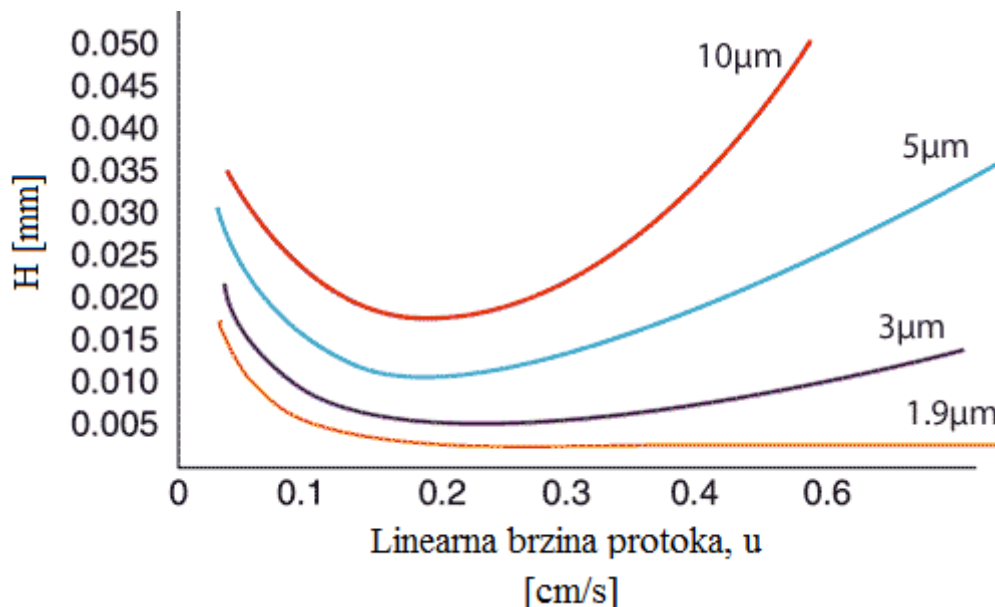
Slika 8. Kromatogram [17]

2.9. Analiza farmaceutika u okolišu

Najčešće korištena vrsta kromatografije za analizu uzoraka iz okoliša je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC). To je kromatografija u stupcu, pri čemu se pokretna faza eluira kroz kolonu pod utjecajem visokog tlaka (400 bar). HPLC kolone su punjene nepokretnom fazom koju čine čvrsto pakirane male čestice (3-10 μm) uniformne veličine. To omogućava odlično kromatografsko razlučivanje, ali i zahtjeva naprednu analitičku opremu koja može stvoriti potrebne uvjete za analizu. Analizirani uzorak se injektira u tekuću pokretnu fazu, te pod visokim tlakom prolazi kroz kolonu koja je punjena krutim sorbensom. Izbor kromatografske kolone ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima analiziranih analita. Osnova podjela HPLC kolona, je prema vrsti punila. Za analizu okoliša najčešće se primjenjuje kromatografija obrnute faze pri kojoj kromatografska kolona sadrže polarni silikagel koji je modificiran pogodnom nepolarnom funkcionalnom skupinom na koju se adsorbiraju nepolarni analiti (C18 i C12). Ako je kolona punjena nepolarnim česticama, mobilna faza će biti polarna [5].

Sve češće se koristi ultra djelotvorna tekućinska kromatografija (eng. *Ultra performance liquid chromatography*, UPLC) ili ultra visoko djelotvorna tekućinska kromatografija (eng. *Ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC) [5]. Čestice kojima su punjene UHPLC kolone (0,75-1,8 μm) su manje veličine u odnosu na HPLC kolone, a tlak koji se koristi za pokretanje pokretne faze (1000 bar) je viši. Osnovni princip rada je isti kao i kod HPLC-a, no primjenom UHPLC kromatografije postiže se bolja preciznost, niže granice detekcije, veće brzine analize i bolje razlučivanje. Prema Van

Deemter-ovoj jednadžbi kolone punjene manjim česticama postižu niže vrijednosti H te je moguće koristiti veći raspon protoka bez da to utječu na H (Slika 9) [18].



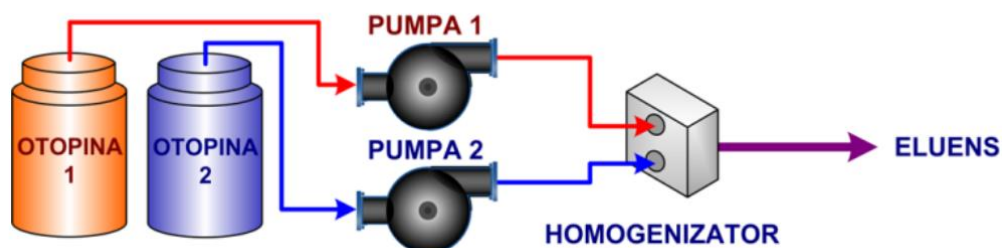
Slika 9. Utjecaj veličine čestica na u i H [19]

Što je H niži, to je veći broj teoretskih odsječaka u koloni (N). Što je veći N to je veći kapacitet pikova (P), tj. broj pikova koji se mogu razdvojiti u koloni [18, 20]. Što je veći P to je bolje razlučivanje.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} * \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) * \left(\frac{k}{k+1} \right) \quad (9)$$

$$N \propto \frac{1}{dP} \quad (10)$$

Eluiranje kolone pokretnom fazom može biti izokratno ili gradijentno. Kod izokratnog eluiranja, sastav pokretne faze je konstantan tijekom cijele analize. Tijekom gradijentnog eluiranja sastav pokretne faze je promjenjiv. To se postiže korištenjem dvije, tri ili četiri otapala koja se pomiješaju u homogenizatoru. Kad se koriste dva otapala, A i B, jedno je vodena faza (puferska otopina), a drugo neko organsko otapalo (npr. acetonitril). Gradijentno eluiranje započinje ispiranjem eluensom niske moći eluiranja, kako bi se omogućilo razdjeljivanje slabo zadržanih komponenti. Potom se mijenja sastav pokretne faze kako bi se omogućilo eluiranje komponenata većeg afiniteta prema nepokretnoj fazi. Gradijentno eluiranje koristi se za analizu uzoraka koji sadrže velik broj komponenata, nečistoća ili nepoznatu maticu. Kod gradijentnog eluiranja s 2 otapala, dvije zasebne visokotlačne pumpe pumpaju otapala iz različitih spremnika kako je prikazano na slici 10. [15].

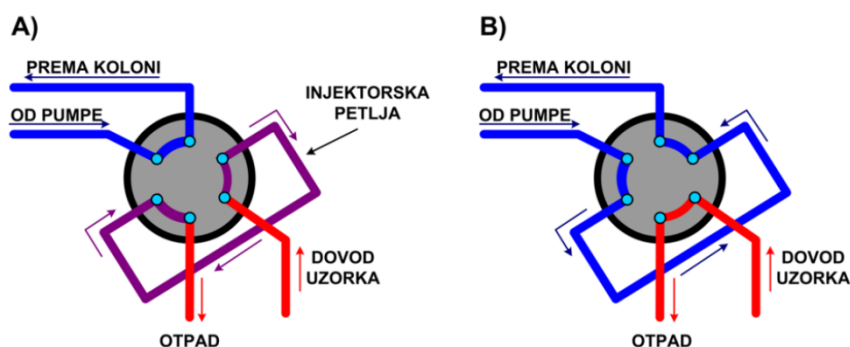


Slika 10. Sustav miješanja otapala pri visokom tlaku [15]

Osnovna oprema HPLC uređaja su spremnici za otapala, visokotlačne pumpe, automatski injektor, kolona, detektor, snimač, uređaj za obradu podataka i spremnik za otpad.

Visokotlačne pumpe su ključni dio svakog HPLC-a. Moraju biti sposobne ostvariti protok od 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ do 10 mL/min , sa preciznošću od 1 %, pri zadanom tlaku [15].

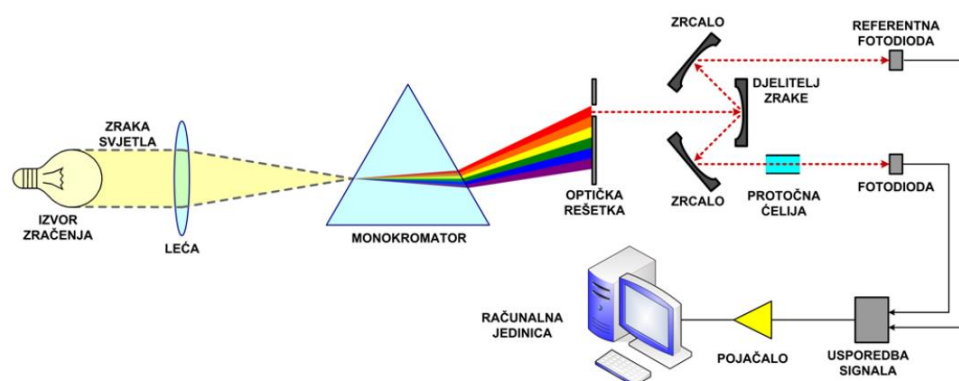
Unošenje uzorka u HPLC sustav provodi se pomoću injektora. Injektor je ventil koji se uobičajeno sastoji od 6 mjesta za priključak. U prvoj fazi uzorak se unosi kontinuiranim protokom u petlju točno definiranog volumena. Za to vrijeme eluens kontinuirano prolazi kroz kolonu bez kontakta s injektorskom petljom. Zakretanjem ventila tok eluensa se preusmjerava na injektorsku petlju, pri čemu sadržaj injektorske petlje prolazi dalje kroz sustav prema kromatografskoj koloni i detektoru (Slika 11) [15].



Slika 11. Unošenje uzorka u HPLC sustav A) punjenje injektorske petlje i B) injektiranje [15]

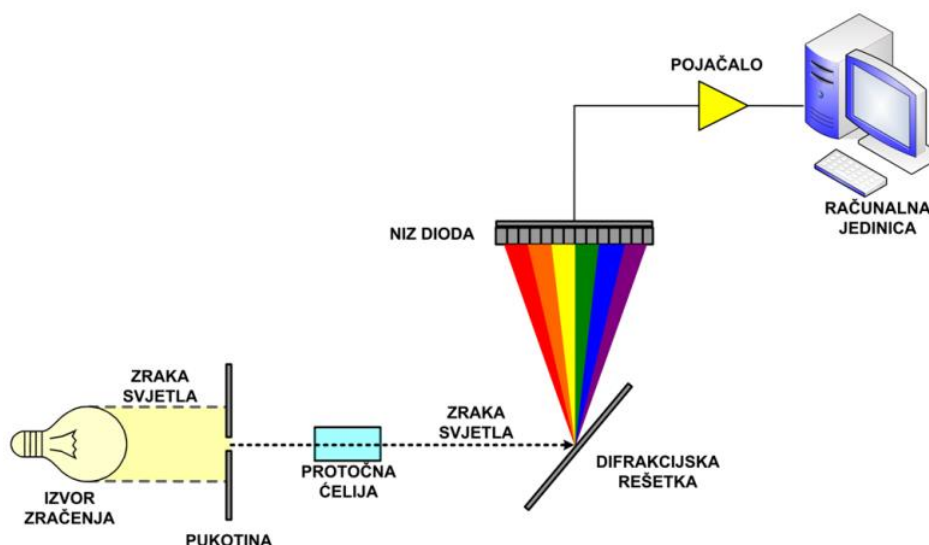
Najčešće korišteni detektori u HPLC sustavima su UV/VIS detektori i u zadnje vrijeme spektrometri masa. UV/VIS detektori se dijele na detektore sa stalnom valnom duljinom, promjenjivom valnom duljinom, te detektori s nizom dioda (eng. *diode array detector*, DAD). UV detektor sa stalnom valnom duljinom sastoji se od izvora zračenja koji je obično niskotlačna živina lampa. Mjeri apsorbanciju pri samo jednoj valnoj duljini,

uobičajeno pri 254 nm. Zbog zastarjele konstrukcije i niza ograničenja ne nalazi primjenu u HPLC metodama. UV/VIS detektor promjenjive valne duljine mjeri pri jednoj valnoj duljini, no ona se može mijenjati u rasponu valnih duljina između 190 i 800 nm. Za dobivanje monokromatske svjetlosti različitih valnih duljina koriste monokromator (Slika 12). Također, u pravilu, imaju sustav za dijeljenje zrake svjetlosti na mjerenu i referentnu. Prilagođavanjem valne duljine svakom uzorku povećava se osjetljivost i selektivnost analize [15].



Slika 12. UV/VIS detekcija pri različitim valnim duljinama [15]

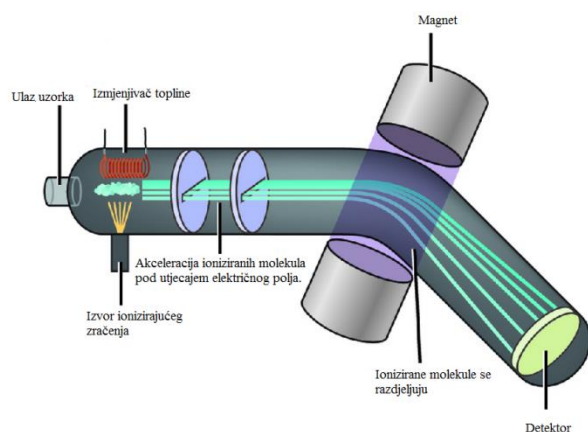
Detektor s nizom dioda (Slika 13) istovremeno mjeri apsorbanciju u određenom rasponu valnih duljina. Snima cjelokupan spektar za svako vrijeme zadržavanja. Svaka dioda je zadužena za mjerenje apsorbancije pri određenoj valnoj duljini, a najčešće ih je oko 1000. Određuje i maksimalnu valnu duljinu koju sastojak apsorbira, što povećava osjetljivost metode i čistoću kromatografskog pika [15].



Slika 13. UV/VIS detekcija s nizom dioda [15]

Posljednjih nekoliko godina sve se više koriste spregnute HPLC-MS tehnike. Zamjenjuju analitičke tehnike koje koriste detektor s nizom dioda i fluorescentni detektor, jer omogućavaju postizanje niže granice dokazivanja i kvantifikacije, te omogućuju utvrđivanje struktura nepoznatih spojeva. HPLC-MS je napredna analitička metoda kojom je moguće detektirati i identificirati farmaceutike čak i pri koncentracijama reda veličine ng/L. Izbor metode ovisi o fizikalnim i kemijskim svojstvima ispitivanih tvari [14].

Spektrometar masa (MS) detektira sastojke uzorke na temelju omjera relativne molekulske mase sastojka uzorka i njegovog naboja (m/z) koji je karakterističan za svaki kemijski spoj. Analizirani analiti se ioniziraju, a ponekad i fragmentiraju zbog čega im naboj obično iznosi +1, te je omjer m/z jednak relativnoj molekulskoj masi ioniziranog analita. Osnovni princip rada spektrometra masa prikazan je na slici 14. [14].



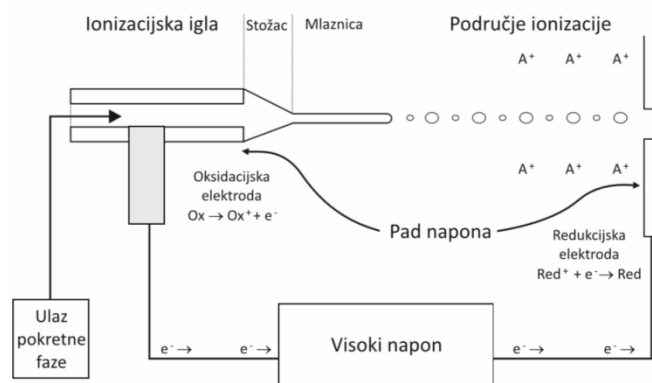
Slika 14. Shematski prikaz spektrometra masa [21]

Nakon što uzorak uđe u spektrometar masa, prelazi u parno stanje pod utjecajem visokog vakuuma i odgovarajuće temperature, te se ionizira ionizirajućim zračenjem. Nakon toga se nastali ioni akceleriraju pod utjecajem električnog polja, a potom pod utjecajem magnetskog polja i centripetalne sile svaka molekula mijenja putanju prema svojoj specifičnoj masi i naboju. Radijus putanje je razmjeran relativnoj masi, te je obrnuto proporcionalan naboju ionizirane molekule. Sastojci uzorka najmanje relativne molekulske mase će imati najkraću putanju [22].

Molekule analita se ioniziraju različitim tehnikama koje se razlikuju po količini energije koja se primjenjuje tijekom procesa ionizacije, te fizikalno-kemijskim svojstvima analita koji se ionizira. Razlikujemo meku i tvrdu ionizaciju. Meka ionizacija provodi se pri manjim količinama energije dajući signal za molekulski ion određivanog analita uz vrlo mali broj fragmentnih iona, dok veliki broj fragmentnih iona nastaje pri tvrdoj ionizaciji kada se

koriste velike količine energije. Uzorci koji se ioniziraju mogu biti u plinovitom, krutom i otopljenom stanju. Od posebnog značaja je ionizacija u otopljenom stanju, jer omogućava neposredno povezivanje HPLC-a/UPLC-a i spektrometrije masa. Za takve uzorke koriste se meke ionizacijske tehnike pri atmosferskom tlaku (eng. *Atmospheric pressure ionization*, API) kao što su toplinska ionizacija raspršenjem (eng. *Thermospray ionization*, ESI), ionizacija elektroraspršenjem (eng. *Electrospray ionization*, ESI), kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (eng. *Chemical ionization*, CI) i ionizacija fotonima pri atmosferskom tlaku (eng. *Atmospheric pressure photon ionization*, APPI) [22].

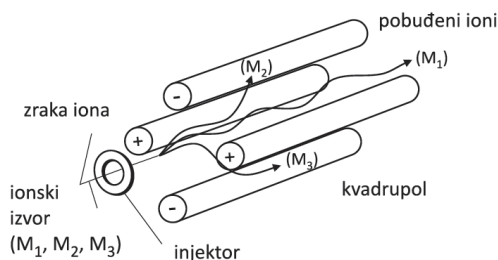
Jedna od najčešće korištenih tehnika je ionizacija elektroraspršenjem (Slika 15). Može se primijeniti na polarne, nepolarne i termički nestabilne spojeve. Otopina koja sadrži analit unosi se u metalnu kapilaru na koju se pri atmosferskom tlaku primjenjuje jako električno polje. U trenutku kad jakost električnog polja dostigne kritičnu vrijednost nastaje tzv. Taylorov stožac u kojem se kontinuirano stvaraju kapljice obogaćene pozitivno nabijenim ionima koji se pod utjecajem potencijala i dušika smanjuju u sve sitnije i sitnije kapljice. Na kraju nastanu nabijene molekule analita oko kojih se stvara sfera uparenog otapala [22].



Slika 15. Ionizacija elektroraspršenjem [17]

Nakon što uzorak prođe ionizaciju, ulazi u analizator masa čija je uloga razdvajanje nastalih iona u vakuumu na temelju omjera mase i naboja. Analizatori moraju biti sposobni analizirati širok raspon masa u vrlo kratkom vremenskom periodu s ciljem provođenja što više analiza (najmanje 10) po kromatografskom piknu. Prema načinu primjene električnog polja razlikuju se linearni analizator masa s ionskom klopkom (eng. *Linear ion trap*, LIT), orbitalni analizator masa s ionskom klopkom (eng. *Orbitrap*), Ionsko-ciklotronski rezonantni analizator masa (eng. *ion cyclotron resonance instruments*, ICR), analizator masa s mjerenjem vremena preleta (eng. *Time of flight*, TOF), kvadrupolni analizator masa (eng. *Quadrupole mass analyser*, Q). [17]

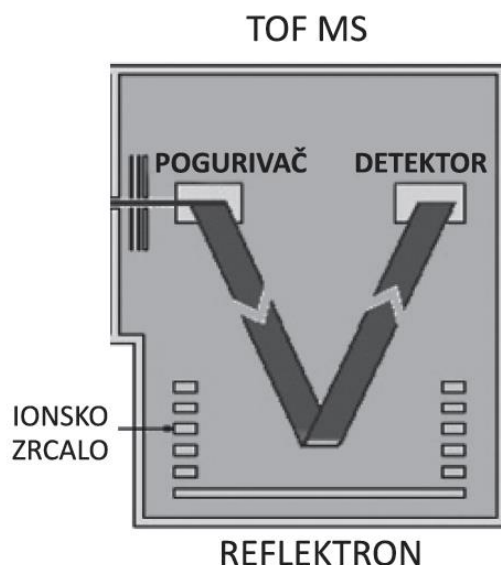
Kvadrupolni analizator (Slika 16) jedan je od najzastupljenijih analizatora. Sastoji se od 4 dijagonalne elektrode koje su električki povezane. Jedan par ima pozitivan, a drugi negativan polaritet. Ti parovi su spojeni radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje koji je za 180° izvan faze. Ioni koji ulaze u analizator imaju različite vrijednosti m/z i u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralne molekule. Kvadrupolni analizator može maksimalno razdvojiti ione čija razlika u masi nije veća od 0,5 amu (eng. *atomic mas unit*). Ako se kvadrupol koristi kao jedini analizator, gornja granica područja mjerenja masa je oko 4000 amu [17].



Slika 16. Presjek kvadrupola [17]

TOF (Slika 17.) zahvaljujući svojoj brzini omogućava skeniranje nekoliko stotina spektara u sekundi što je 10 puta više u odnosu na ostale analizatore. Separacija iona se temelji na brzini koja je potrebna svakom ionu da prođe određenu udaljenost između ionizatora i detektora, a masa iona se računa prema vremenu potrebnom da ion prijeđe taj put. Ioni jednakih kinetičkih energija, ali različitih omjera m/z putuju različitim brzinama. Ioni većih m/z omjera putuju manjom brzinom u odnosu na ione manjih m/z omjera [22]. Ioni mogu ući aksijalno ili ortogonalno u analizator (eng. *pusher*), on ih sakuplja u određenom vremenu, te zatim istovremeno otpušta, a u trenutku otpuštanja uključuje se mjerenje vremena leta do detektora. Vrijeme leta iona od pushera do detektora je između 5-100 μs [17]. Rezolucija TOF analizatora ovisi o sposobnosti da izmjeri vrlo male razlike između analita sličnih m/z omjera. Povećanjem udaljenosti koju ioni moraju prijeći između izvora i detektora povećava se i rezolucija. No, to ne znači da se povećava i duljina instrumenta. Korištenjem ionskih ogledala (eng. *reflectron*, *ion mirror*) koji reflektiraju ionizirane molekule povećava se put koji pređu. Ugradnjom jednog ionskog ogledala, put koji ionizirane molekule prođe se udvostruči [23]. Mogućnost dobivanja točne mase i cijelog spektra u kratkome vremenu čini TOF/MS vrlo prikladnim za karakterizaciju zagađenja u uzorcima iz okoliša [17]. TOF-MS je važan i za identifikaciju i analizu neodređenih analita u složenim uzorcima iz okoliša.

Velika prednost TOF-MS-a je mogućnost određivanja točne mase uz pogrešku manju od 2 mDa [25].



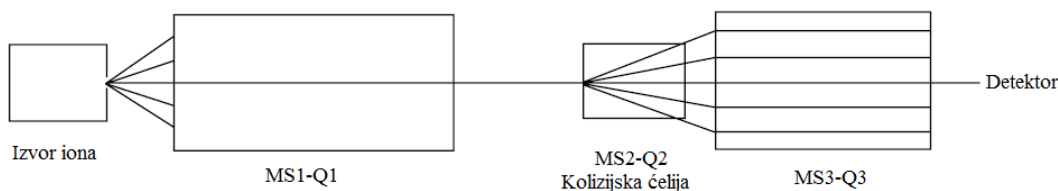
Slika 17. Shema TOF-a [17]

2.10. Spregnuta spektrometrija masa (MS^n)

Velika prednost spektrometrije masa je njena sposobnost određivanja mase i molekulske strukture nepoznatog analita. Spregnuta spektrometrija masa je proces u kojemu izbor masa slijedi jedan za drugim. MS/MS instrumenti mogu biti spregnuti vremenski ili prostorno. Prostorno spregnuti instrumenti imaju odvojene analizatore masa u svakom stupnju, dok vremenski spregnuta spektrometrija masa provodi analizu u istom analizatoru za sve stupnjeve MS/MS analize. Ioni nastali u ionskim izvoru ulaze u analizator masa, u kojem se u prvom stupnju izdvaja željeni ion. Izabrani ion uvodi se u kolizijsku ćeliju u kojoj se fragmentacija postiže sudarom s atomima argona. Nakon sudara s molekulama plina nastaju fragmenti iona izabranog iona odnosno ioni produkti koji se analiziraju u drugom analizatoru MS^2 , te na kraju detektiraju [14, 17].

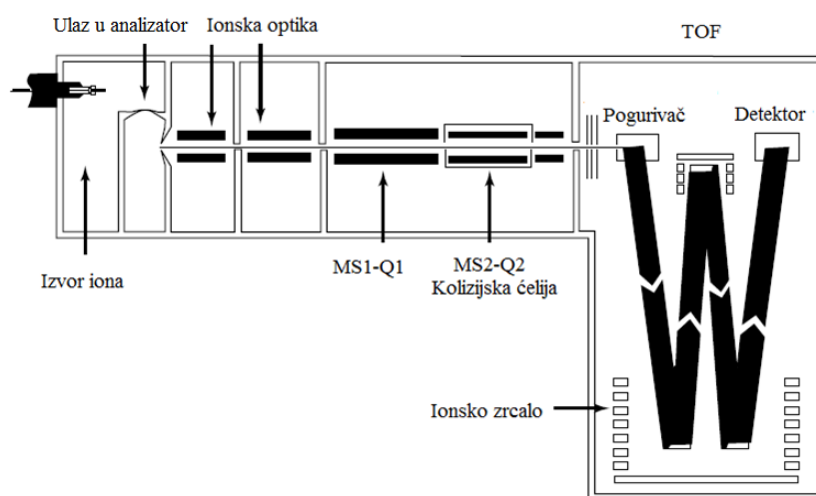
Jedan od najčešće korištenih MS/MS instrumenata za analizu farmaceutika u okolišu je trostruki kvadripol (eng. *The triple Quadrupole*, QqQ) (Slika 18.). Sastoji se od 3 para serijski spojenih elektroda. Drugi par elektroda ($MS2-Q2$) se ne koristi za separaciju iona različitih masa, već kao kolizijska ćelija. Prvi par elektroda ($MS1-Q1$) emitira ione u kolizijsku ćeliju u kojoj se postiže sudar s atomima argona. Nakon sudara s molekulama plina nastaju fragmenti i usmjeravaju se prema trećem paru elektroda ($MS3-Q3$) [23]. Koristi se za

kvantitativno određivanje početnog spoja farmaceutika ili njegovog razgradnog produkta ukoliko je standard dostupan, dok se praćenje fragmentnih iona i praćenje neutralnog gubitka koriste za utvrđivanje struktura razgradnih produkata [24].



Slika 18. Trostruki kvadripol [23]

Kvadripolni analizatori se često hibridiziraju s TOF-om (eng. *Hybrid quadrupole-time of flight*, Qq-TOF) (Slika 19.). TOF se postavlja na mjesto trećeg para elektroda (MS3-Q3) [23]. Takav instrument omogućava fragmentaciju molekula uzorka uz točno utvrđivanje mase svih fragmentnih iona [24].



Slika 19. Presjek hibridnog analizatora MS/MS [23]

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.2. Kemikalije

U tablici 3. su prikazane kemikalije korištene tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, njihove molekulske formule, čistoća i proizvođači.

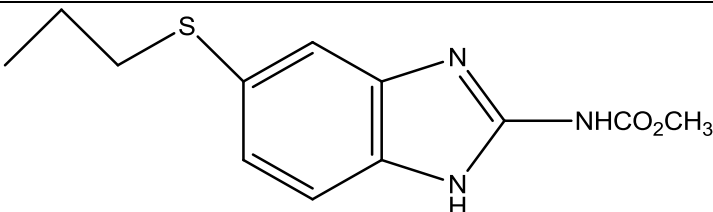
Tablica 3. Popis kemikalija

Naziv	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
Acetonitril	CH ₃ CN	HPLC	Lachner, Češka
Amonijak	NH ₃	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Borna kiselina	H ₃ BO ₃	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Dikalijev fosfat	K ₂ HPO ₄	p.a.	Kemika Hrvatska
Huminske kiseline	-	p.a.	Sigma Aldrich, SAD
Kalijev klorid	KCl	p.a.	Lachner, Hrvatska
Kalijev monofosfat	KH ₂ PO ₄	p.a.	Kemika, Hrvatska
Limunska kiselina	C ₆ H ₈ O ₇	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
Mravlja kiselina	CH ₂ O ₂	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
Mravlja kiselina	CH ₂ O ₂	99 %	Biossolve, Francuska
Natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Natrijev nitrat	NaNO ₃	p.a.	Kemika, Hrvatska

3.1.3. Albendazol

U ovom radi ispitivana je fotolitička razgradnja antihelminitika albendazola, CAS broj 54965-21-8 (Veterina, Hrvatska) čistoće 99%. Fizikalno-kemijska svojstva albendazola prikazana su u tablici 4.

Tablica 4. Fizikalno-kemijska svojstva albendazola

Generičko ime	Albendazol
IUPAC [13]	methyl N-[5-(propylsulfanyl)-1H-1,3-benzodiazol-2-yl] carbamate
Molarna masa [g/mol] [13]	265,33
CAS broj [13]	54965-21-8
Struktura molekule	
Logaritam konstante ionizacije kiseline (pK_a) [13]	9,68
Logaritam konstante ionizacije baze (pK_b) [13]	4,21
Izoelektrična točka [13]	6,94
Topljivost u vodi (mg/mL) [25]	0,0228
Talište °C [25]	208-210
Proizvođač	Veterina
Čistoća	99 %

3.2. Instrumenti

3.2.1 pH-metar

Za određivanje pH-vrijednosti uzoraka, korišten je pH-metar S20 SevenEasy (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska). Specifikacije korištenog pH-metra su:

- raspon vrijednosti: 0 – 14,
- rezolucija: 0,01 pH
- temperaturni raspon: 5 °C - 105 °C

Staklena elektroda i referentna elektroda nalaze se u zajedničkom kućištu. Kako bi se osigurala preciznost instrumenta, prije samog mjerenja pH-metar je umjeren puferima poznatih pH-vrijednosti (pH 4 i 7). Elektroda je umetnuta u otopinu, gdje su H^+ ioni dovedeni u ravnotežu s ionima na površini staklene elektrode. Postignuto ravnotežno stanje se očitovalo kao stabilizacija pH-vrijednosti na zaslonu pH metra. (Slika 19.)



Slika 19. pH-metar S20 SevenEasy

3.2.2. Elektronička analitička vaga

Za precizno određivanje mase uzoraka korištene su elektroničke analitičke vage. Vaga model XS204 DeltaRange (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska), prikazana na slici 20., korištena je za odvage do 10 mg. Specifikacije ove vage su:

- maksimalni kapacitet: 220 g,
- očitavanje: 0,1 mg,
- minimalna odvaga ($U=1\%$, $s=2$): 8 mg,
- područje tare: 0 – 220 g,
- linearnost: 0,2 mg,
- ponovljivost pri maksimalnom kapacitetu (s): 0,1 mg

Vaga, model AB104 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska), prikazana na slici 21., korištena je za odvage veće od 500 mg. Specifikacije ove vage su: maksimalni kapacitet: 110 g, očitavanje: 0,1 mg, područje tare: 0 - 110 g linearnost: 0,2 mg, ponovljivost pri maksimalnom kapacitetu (s): 0,1 mg.

Moderne elektroničke laboratorijske vage temelje se na mjerenju struje potrebne da se pokretna elektromagnetska zavojnica vrati na svoju nultu poziciju iz koje je pomaknuta zbog opterećivanja vage tijelom čija se masa mjeri.



Slika 20. XS204 DeltaRange



Slika 21. AB104

3.2.3. Suntest CPS+

Fotolitička razgradnja uzoraka provedena je na Suntest CPS+ uređaju (Atlas, Linsengericht, Njemačka) koji je prikazan na slici 22. Uređaj je opremljen ksenonovom lampom koja generira spektar elektromagnetskog zračenja sličan Sunčevom zračenju u okolišu (200 - 800 nm). Ukoliko je potrebno, moguće je namjestiti da se sunčanje odvija u fazama (1 - 6). Svaka faza može imati različite eksperimentalne uvjete. Moguće je podešavati temperaturu (15 - 100 °C), intenzitet zračenja (250 - 765 W m⁻²) i vrijeme izlaganja zračenju (0 – 480 minuta).



Slika 22. Suntest CPS+

3.2.4. Spektrofotometar

Apsorpcijski spektri snimani su na dvozračnom UV/VIS spektrofotometru LAMBDA 35 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD) (slika 23.). Valne duljine se mogu podešavati u rasponu od 190 – 1100 nm s preciznošću od $\pm 0,1$ nm. Osnovne komponente su deuterijska lampa, detektor s 2 diode, jedan monokromator, 2 postolja za kvarcne kivete i kućište instrumenta.

Spektrofotometar je instrument koji mjeri količinu svjetla koju uzorak apsorbira. Zraka svjetlosti propušta se kroz uzorak, te se mjeri intenzitet svjetlosti koja je došla do detektora. Dobiveni podaci pružaju informacije o strukturi materijala od kojih se uzorak sastoji. Pri sudaru fotona s molekulom analita može doći do njegove apsorpcije, ovisno o strukturi molekule i energiji (valnoj duljini) fotona. Apsorpcija smanjuje broj fotona u zraci svjetlosti, odnosno njezin intenzitet. Ovisno o strukturi molekule i energiji fotona, pri prolasku svjetlosti kroz uzorak, dolazi do apsorpcije fotona prilikom sudara s analitom ili maticom, pri čemu se smanjuje njihov broj u zraci svjetlosti.



Slika 23. Dvozračni UV/VIS spektrofotometar

3.2.5. Tekućinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa (UHPLC/MS-QTOF)

Promjena koncentracije albandazola u uzorcima izloženim umjetnom Sunčevom zračenju praćena je analitičkim instrumentom UHPLC-a 1290 infinity (Agilent Technologies, SAD) koji je prikazan na slici 24. Separacija albandazola i njegovih razgradnih produkata u uzorcima provedena je na koloni SynergyTM Hydro-RP 100 Å LC (Phenomenex, SAD). Dimenzije kolone su iznosile 100 x 2 mm, dok je promjer čestica unutar kolone iznosio 2,5 µm. Identifikacija albandazola i njegovih razgradnih produkata provedena je na spektrometru masa iFunnel 6550A Q-TOF UHPLC/MS (Agilent Technologies, SAD) (Slika 25.) koji je povezan s UHPLC-om. Ionizacija uzoraka je provedena elektroraspršenjem u pozitivnom modu.



Slika 24. Agilent 1290 infinity



Slika 25. 6550A iFunnel Q-TOF UHPLC/MS

UHPLC sustav se sastoji od kućišta s postoljem za otopine za pokretnu fazu, binarne i kvartarne pumpe, automatskog dodavača uzorka, kanala (A, B, C, D) i termostatirane komore za kolone (moguće je koristiti 2 kolone istovremeno).

Primarne komponente Q-TOF-a su automatski dodavač uzorka, elektroraspršivač (ionizator) i analizator masa koji se sastoji od dva dijela: serijski spojenih kvadripola i TOF-a.

UHPLC/MS-QTOF je opremljeno računalom preko kojeg se kontrolira rad instrumenta.

3.3. Metoda rada

Fotolitička razgradnja albendazola praćena je u MilliQ vodi. Za ispitivanje utjecaja pH vrijednosti vode na fotolitičku razgradnju albendazola, pripremljene su vodene otopine albendazola u otopinama pufera različitih pH-vrijednosti. Također, ispitan je utjecaj uobičajenih sastojaka prirodnih voda te su u tu svrhu u standardnu otopinu albendazola dodane huminske kiseline, nitrati, i bikarbonatima.

3.3.1. Priprema otopine albendazola u MilliQ vodi

Pripremljene su otopine albendazola koncentracija 1 i 5 mg·L⁻¹. Za pripremu otopine koncentracije 5 mg·L⁻¹, točno je odvagano je 2,54 mg albendazola i otopljeno u 500 mL MilliQ vode. Za pripremu otopine koncentracije 1 mg·L⁻¹, 40 mL otopine koncentracije 5 mg·L⁻¹ preneseno je u odmjernu tikvicu od 200 mL, te je MilliQ vodom nadopunjena do oznake.

Nakon što je odvagani albendazol kvantitativno prenesen u tikvicu, ona je ostavljena 1 h u ultrazvučnoj kupelji, te potom 16 h na magnetskoj mješalici pri 700 o/min.

3.3.2. Priprema otopina albendazola uz dodatak huminskih kiselina

Pripremljene su otopine albendazola koncentracije 5 mg·L⁻¹ s različitom koncentracijom huminskih kiselina: 10 mg·L⁻¹, 5 mg·L⁻¹ i 1 mg·L⁻¹.

Otopina huminskih kiselina koncentracije 10 mg·L⁻¹ pripremljena je otapanjem 5 mg huminskih kiselina u 500 mL MilliQ vode. Tikvica s otopinom ostavljena je 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji. Otopini je dodano 5 mL NH₃ (1 M), te je dodatkom mravlje kiseline zakiseljena do pH-vrijednosti 5,33. 1,27 mg albendazola otopljeno u 250 mL tako pripremljene otopine.

Otopina huminskih kiselina koncentracije 5 mg·L⁻¹ pripremljena je razrjeđivanjem otopine koncentracije huminskih kiselina 10 mg·L⁻¹ na sljedeći način: 250 mL otopine 10 mg·L⁻¹ preneseno je u odmjernu tikvicu volumena 500 mL, te je MilliQ vodom nadopunjena do oznake. U 200 mL tako pripremljene otopine otopljen je 1 mg albendazola.

Otopina huminskih kiselina, koncentracije 1 mg·L⁻¹ pripremljena je razrjeđivanjem otopine 5 mg·L⁻¹. 50 mL otopine 5 mg·L⁻¹ preneseno je u odmjernu tikvicu volumena 250

mL, te je MilliQ vodom nadopunjena do oznake. U 200 mL tako pripremljene otopine otopljen je 1 mg albendazola.

Otopine albendazolac ostavljene su 2 h u ultrazvučnoj kupelji, te 16 h na magnetskoj miješalici pri 700 o/min

3.3.3. Priprema otopina albendazola uz dodatak nitrata

Pripremljene su otopine albendazola koncentracije $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ u kojima je koncentracija nitrata (NaNO_3) iznosila $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ i $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Otopina nitrata koncentracije $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pripremljena je otapanjem 1,5 mg NaNO_3 u 500 mL MiliQ vode. U 250 mL tako pripremljene otopine otopljeno je 1,27 mg albendazola.

Otopina nitrata koncentracije $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pripremljena je razrjeđivanjem otopine koncentracije nitrata koncentracije $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Pipetom je preneseno 83 mL otopine koncentracije $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ u odmjernu tikvicu volumena 250 ml, te nadopunjena do oznake MilliQ vodom. U 250 mL tako pripremljene otopine otopljeno je 1,27 mg albendazola.

Otopine su ostavljene 2 h u ultrazvučnoj kupelji, te 16 h na magnetskoj miješalici pri 700 o/min.

3.3.4. Priprema otopina albendazola različitih pH-vrijednosti

Za praćenje utjecaja pH-vrijednosti na fotolitičku razgradnju albendazola pripremljene su otopine albendazola (5 mg L^{-1}) s različitim pH-vrijednostima: 5, 7 i 9.

Otopina pufera pH-vrijednosti 5 pripremljena je miješanjem 200 mL (0,2 M) dikalijevog fosfata i 300 mL (0,1 M) limunske kiseline. Otopina pH-vrijednosti 7 pripremljena je miješanjem 150 mL (0,1 M) natrijevog hidroksida, 250 ml (0,1 M) kalijeva monofosfata i 100 ml MilliQ vode. Otopina pH-vrijednosti 9 pripremljena je miješanjem 100 mL (0,1M) natrijevog hidroksida i 250 mL (0,1M) borne kiseline u 0,1 M kalijevom kloridu i 150 mL MilliQ vode. Otopine su ostavljene 2 h u ultrazvučnoj kupelji, te 16 h na magnetskoj miješalici pri 700 o/min.

Za dobivanje otopine albendazola koncentracije 5 mg L^{-1} , u 250 mL svakog pufera otopine otopljeno je 1,27 mg albendazola.

3.3.5. Priprema otopina albendazola uz dodatak bikarbonata

Za praćenje utjecaja bikarbonata na brzinu fotolitičke razgradnje albendazola, pripremljene su otopine s koncentracijom albendazola $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ i koncentracijom bikarbonata $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ i $420 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Za pripremu otopine bikarbonata koncentracije $420 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, otopljeno je 210 mg bikarbonata u 500 mL MilliQ vode. U 250 mL tako pripremljene otopine otopljeno je 1,27 mg albendazola. Otopina bikarbonata koncentracije $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pripremljena je razrjeđivanjem otopine koncentracije $420 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Volumen od 42 mL otopine koncentracije $420 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ prenesen je u odmjernu tikvicu od 250 mL, te je tikvica nadopunjena do oznake MilliQ vodom. U 250 mL tako pripremljene otopine otopljeno je 1,27 mg albendazola. Otopine su ostavljene 2 h u ultrazvučnoj kupelji, te 16 h na magnetskoj miješalici pri 700 o/min.

3.3.6. Osvjetljavanje otopina albendazola

Pripremljene otopine albendazola izložene su umjetnom Sunčevom zračenju u trajanju od 8 h. Izuzetak su otopine albendazola s dodatkom nitrata koje su izlagane umjetnom Sunčevom zračenju 24 h. Tijekom eksperimenta intenzitet zračenja iznosio je 500 W/m^2 , dok je temperatura pri kojoj su uzorci sunčani bila $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Kako bi se ispitao utjecaj temperature na brzinu fotolitičke razgradnje, otopina albendazola ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) u MilliQ vodi izlagana je umjetnom Sunčevom zračenju i pri $15 ^\circ\text{C}$ i $35 ^\circ\text{C}$.

Pripremljene otopine izlagane su umjetnom Sunčevom zračenju u kvarcnim posudicama s poklopcem. Za svaku otopinu albendazola pripremljena su 3 paralelna i 1 kontrolni uzorak. 40 mL ispitivane otopine preneseno je u svaku kvarcnu posudicu. Kontrolni uzorak omotan je aluminijskom folijom čime je spriječena fotolitička razgradnja. Kontrolni uzorci korišteni su kako bi provjerili da li je došlo do razgradnje albendazola zbog hidrolize ili povišene temperature. Prije samog sunčanja, iz svake kvarcne kivete uzet je nulti uzorak. Alikvoti ($500 \mu\text{L}$) osunčanih otopina albendazola preneseni su u viala u određenim vremenskim intervalima.

3.3.7. Analiza na QTOF-UHPLC/MS-u

Prije početka same kromatografske analize pripremljene su otopine koje čine pokretnu fazu. Korištenjem računalnog programa Mass Hunter Data Acquisition postavljan je metoda analize i sekvenca. Analize je provedena uz gradijentno eluiranje uz sastav pokretne faze: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Gradijent pokretne faze prikazan je u tablici 5.

Tablica 5. Gradijent pokretne faze

t (min)	Udio A (%)	Udio B (%)
0	90	10
2	90	10
5	5	95
8	5	95
8,01	90	10

Nakon što su postignuti uvjeti zadani u metodi, analiza je počela. U kolonu je injektiran 1 μL uzorka, dok je protok pokretne faze iznosio $0,30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Albendazol i njegovi razgradni produkti detektirani su korištenjem QTOF spektrometra masa. Uvjeti na spektrofotometru masa bili su:

- Temperatura plina: $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- Protok plina: $14 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$
- Tlak raspršivača plina: 2,4 bar
- Napon kapilare: 3500 V

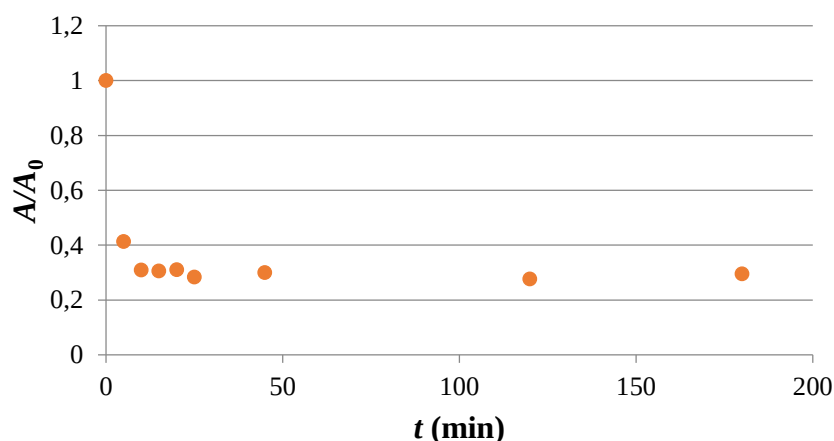
Za obradu rezultata korišten je računalni program Mass Hunter Qualitative Analysis.

4. Rezultati i rasprava

U ovom radu provedena je fotolitička razgradnja albendazola s ciljem istraživanja njegove sudbine u okolišu. S obzirom na opasnost koju predstavlja razvoj rezistentnih helminta, važno je dobro upoznati sudbinu albendazola i njegovih razgradnih produkata u okolišu. Kako bi se simulirali okolišni uvjeti i odredio utjecaj kemijskih spojeva koji se pojavljuju u okolišu na brzinu fotolitičke razgradnje, pripremljene su otopine albendazola s dodatnom kemijskih spojeva uobičajeno prisutnih u okolišu a za koje se smatra da bi mogli utjecati na brzinu fotolitičke razgradnje (huminske kiseline (HA), nitrati i karbonati). Osim toga, ispitan je i utjecaj temperature i pH-vrijednosti. Svi uzorci sunčani su pri 25 °C. Promjena koncentracije u vremenu praćena je i prikazana kao ovisnost relativne površine pika albendazola (A/A_0) u ovisnosti o trajanju izlaganja Sunčevom zračenju. Pri tome, A označava površinu ispod pika u određenom vremenu (t), a A_0 površinu ispod pika početne otopine albendazola ($t=0$).

4.1. Izravna fotolitička razgradnja albendazola

Izravna fotolitička razgradnja ispitana je u otopini koncentracije 5 mg L⁻¹ albendazola pripremljenoj u MilliQ vodi. Izmjerena pH vrijednost otopine iznosila je 4,75. Na slici 26. prikazana je promjena koncentracije albendazola u vremenu. Već nakon 5 minuta izlaganja umjetnom Sunčevom zračenju koncentracija albendazola smanjila se na 41 % početne koncentracije što potvrđuje njegovu podložnost direktnoj fotolizi. Nakon 15 minuta koncentracija se smanjila na 30 % početne koncentracije, nakon čega nije bilo značajne promjene do kraja eksperimenta.



Slika 26. Fotolitička razgradnja albendazola u MilliQ vodi

Grafički prikaz ovisnosti $\ln(A/A_0)$ o vremenu izlaganja Sunčevom zračenju daje linearnu ovisnost uz koeficijent determinacije $R^2=0,9191$, čime je potvrđena kinetiku reakcije prvog reda. Konstanta brzine razgradnje određena je iz nagiba pravca i iznosi $0,1268 \text{ min}^{-1}$ iz čega je izračunato vrijeme poluraspada od 5,47 minuta.

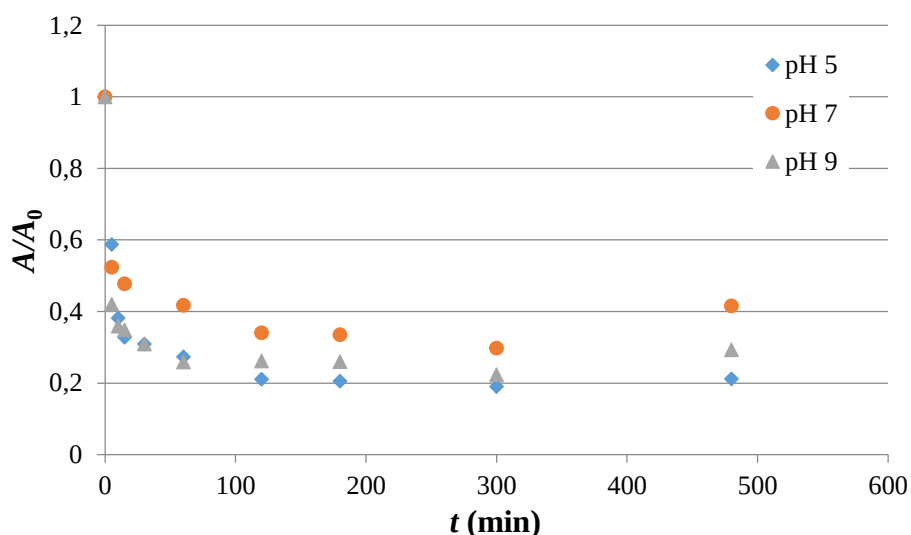
4.1. Neizravna fotolitička razgradnja albendazola

U okviru ovoga rada ispitan je utjecaj huminskih kiselina, nitrata i karbonata te utjecaj pH-vrijednosti i temperature na brzinu fotolitičke razgradnje albendazola.

Ispitana je kinetika fotolitičke razgradnje. Konstante brzine razgradnje određene su iz nagiba pravca koji prikazuje ovisnosti $\ln(A/A_0)$ o vremenu. Što je nagib veći, to je brzina razgradnje veća, odnosno $t_{1/2}$ manje. Određivanje kinetike unutar prvih 15 minuta sunčanja je važno, jer se u tom vremenskom periodu koncentracija albendazola u svim eksperimentima smanji za više od 50 %, nakon čega se daljnja razgradnja odvija znatno sporije.

4.1.1. Utjecaj pH-vrijednosti

pH-vrijednost voda u okolišu uobičajeno se kreće u rasponu od 6 do 8,4. Preporuka je Europske agencije za kemikalije (European, Chemicals Agency, ECHA) da se razgradnja ispituje u području pH vrijednosti 5 do 9. Stoga je otopina albendazola koncentracije 5 mg L^{-1} pripremljena u otopinama pufera pH vrijednosti 5, 7 i 9 s ciljem istraživanja utjecaja aktiviteta H^+ iona na brzinu fotolitičke razgradnje. Na slici 27. može se vidjeti da je brzina fotolitičke razgradnje tijekom prvih 15 minuta najsporija u puferu pH 5, dok nema značajne razlike u brzini razgradnje u puferima pH 7 i pH 9, što se ne slaže s dosada objavljenim istraživanjima [4, 26]. Nakon 15 minuta više nema značajne promjene koncentracije albendazola pri sve tri ispitivane pH vrijednosti.



Slika 27. Fotolitička razgradnja albendazola u puferima

Konstante brzine razgradnje i vremena poluraspada pri tri pH vrijednosti (5, 7 i 9) prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Konstante brzine razgradnje (k) i vremena poluraspada ($t_{1/2}$) za prvih 15 minuta fotolitičke razgradnje albendazola pri različitim pH-vrijednostima

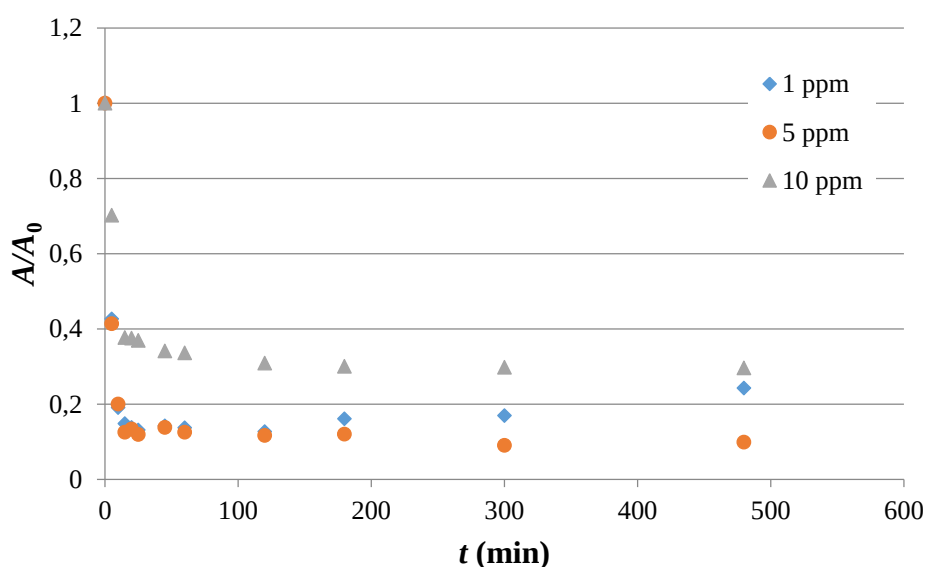
Eksperimentalni uvjeti	k (min ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (min)
MilliQ	0,1268	0,9191	5,47
pH			
5	0,0754	0,9496	9,19
7	0,0818	0,9000	8,47
9	0,0810	0,9868	8,56

Prema slici 5. i tablici 2 pri tri pH vrijednosti (5, 7 i 9) prisutna su 3 oblika albendazola, protonirani, neutralni i deprotonirani, pri čemu je neutralni oblik dominantan.

4.1.2. Utjecaj huminskih kiselina

Da bi se ispitao utjecaj HA na brzinu fotolitičke razgradnje albendazola, u otopinu albendazola koncentracije 5 mg L⁻¹ dodano je 1, 5 i 10 mg L⁻¹ HA. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 28. Kod otopina koncentracija 1 i 5 mg L⁻¹ koncentracija albendazola smanjila se na 40 % početne vrijednosti već nakon 5 minuta trajanja eksperimenta, dok je u

otopini 10 mg L⁻¹ trebalo 10 minuta da postigne slično smanjenje koncentracije. U usporedbi s MilliQ vodom, prisutnost 1 i 5 mg L⁻¹ HA nema značajan utjecaj na brzinu fotolitičke razgradnje albendazola u prvih 15 minuta sunčanja (tablica 5). Kod otopine HA koncentracije 10 mg L⁻¹ velika je razlika u odnosu na MilliQ vodi. Nakon 5 minuta sunčanja koncentracija albendazola smanjila se samo 30 %, što je 1,69 puta manje u odnosu na MilliQ vodu nakon čega poprimaju slične vrijednosti do kraja sunčanja. Za sve tri ispitivane koncentracije HA vrijedi da nakon 15 minuta sunčanja više nema značajnih promjena u koncentraciji albendazola do kraja sunčanja. U jednom istraživanju predloženo je da pri manjim koncentracijama huminskih kiselina postoji veći broj aktivnih mjesta za formiranje radikala •OH, dok pri većim koncentracijama apsorbiraju dio Sunčevog zračenja koje bi inače uzrokovalo formiranje radikala [27].



Slika 28. Fotolitička razgradnja albendazola uz prisutnost HA

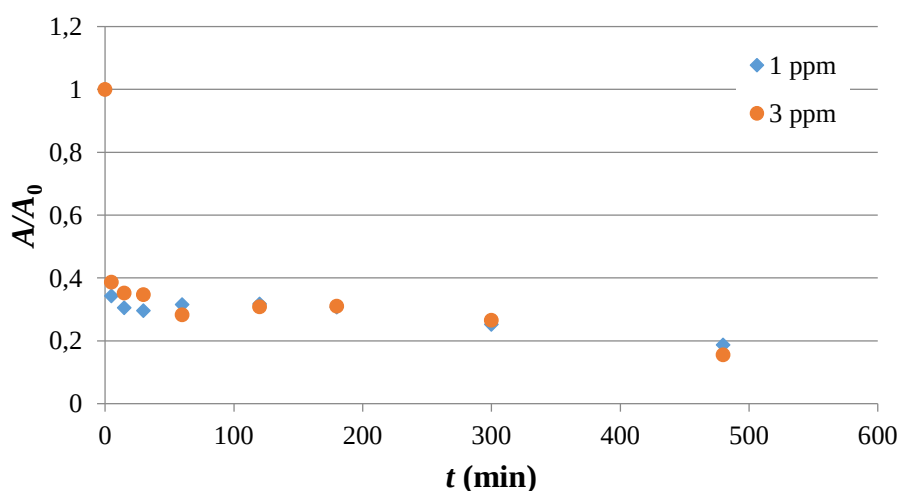
Konstante brzine razgradnje i vremena poluraspada uz prisutnost HA prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Konstante brzine razgradnje (k) i vremena poluraspada ($t_{1/2}$) za prvih 15 minuta fotolitičke razgradnje albendazola uz HA

Eksperimentalni uvjeti	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
MilliQ	0,1268	5,47
Huminske kiseline		
1 ppm	0,1293	5,36
5 ppm	0,1379	5,03
10 ppm	0,0689	10,06

4.1.3. Utjecaj nitrata

S ciljem istraživanja utjecaja nitrata na brzinu fotolitičke razgradnje albendazola, pripremljene su otopine albendazola koncentracije 5 mg L^{-1} u kojima je koncentracija nitratabila 1 mg L^{-1} , odnosno 3 mg L^{-1} . Na slici 29. se može vidjeti da nema značajne razlike između brzine fotolitičke razgradnje albendazola u otopinama nitrata različitih koncentracija. U oba slučaja je koncentracija albendazola, nakon 5 minuta trajanja eksperimenta, pala ispod 40 % početne vrijednosti što je vrlo slično trendu razgradnje albendazola u MilliQ vodi.



Slika 29. Utjecaj nitrata na fotolitičku razgradnju albendazola

Nitrati ubrzavaju fotolitičku razgradnju, no u ovom slučaju nije uočeno njihov utjecaj na fotolitičku razgradnju albendazola. Nakon naglog smanjenja koncentracije albendazola na

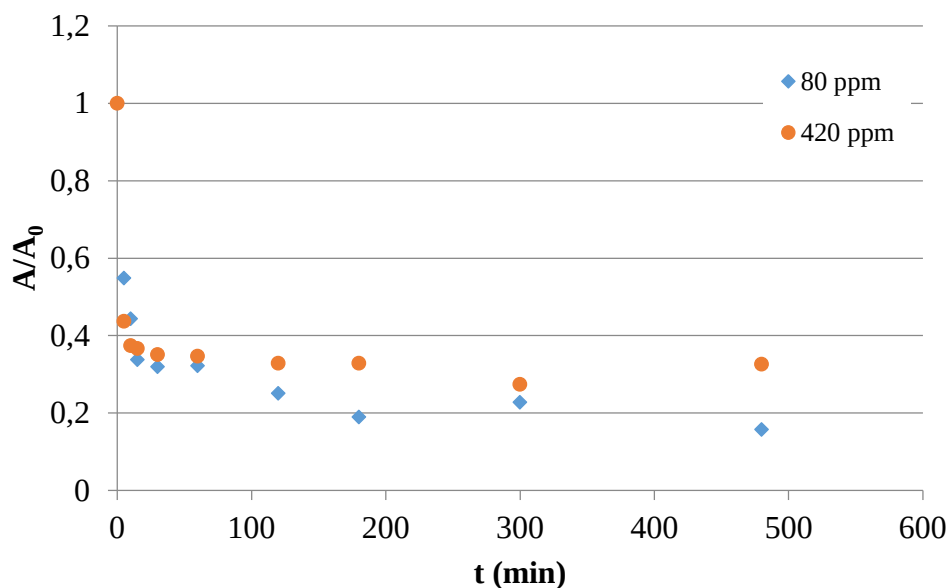
početku eksperimenta, nakon 15 minuta sunčanja nije bilo značajnije promjene koncentracije albendazola.

4.1.4. Utjecaj karbonata

S ciljem istraživanja utjecaja karbonata na brzinu fotolitičke razgradnje albendazola, pripremljene su otopine koncentracije albendazola 5 mg L^{-1} s različitim koncentracijama karbonata (80 i 420 mg L^{-1}). U tablici 8. može se vidjeti da tijekom prvih 15 minuta sunčanja nema značajne razlike u brzini fotolitičke razgradnje između albendazola u MilliQ vodi i albendazola u 420 mg L^{-1} . Kada je koncentracija karbonata manja (80 mg L^{-1}) fotolitička razgradnja nešto je sporija. Fotolitička razgradnja albendazola u 420 mg L^{-1} nakon 60 minuta sunčanja postaje sporija što se može pripisati *scavenger efektu* koji je jači zbog veće koncentracije karbonata iz koje mogu nastajati radikali $\bullet\text{CO}_3^-$. Nakon 15 minuta, nije uočena značajnija promjene koncentracije albendazola (slika 30).

Tablica 8 Konstante brzine razgradnje (k) i vremena poluraspada ($t_{1/2}$) za prvih 15 minuta fotolitičke razgradnje albendazola u prisutnosti karbonata

Eksperimentalni uvjeti	$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (min)}$
MilliQ	0,1268	5,47
Karbonati		
80 ppm	0,0765	9,06
420 ppm	0,0984	7,05



Slika 30. Fotolitička razgradnja ALB u karbonatima

Izmjerena pH vrijednost otopine albendazola uz prisutnost karbonata iznosila je 8,30 za koncentraciju karbonata 80 mg L^{-1} , odnosno 9,02 za 420 mg L^{-1} otopinu što znači da su u otopinama prevladavali hidrogenkarbonatni ioni (HCO_3^-). Oni vežu radikale $\bullet\text{OH}$ (*scavenger efekt*), pri čemu nastaju radikali $\bullet\text{CO}_3^-$ koji su selektivniji i manje reaktivni u odnosu na $\text{OH}\bullet$. Rezultat je sporija razgradnja albendazola. U tablici 6 može se vidjeti da je k albendazola u otopini koncentracije 80 mg L^{-1} karbonata niža u odnosu na otopinu koncentracije karbonata 420 mg L^{-1} . To bi se moglo pripisati pH-vrijednosti.

5. Zaključci

U ovom radu istraživana je izravna i neizravna fotolitička razgradnja antihelmintika albendazolu u okolišu pri 25 °C.

U okviru istraživanja neizravne fotolitičke razgradnje, ispitan je utjecaj huminskih kiselina (1, 5 i 10 mg L⁻¹), nitrata (1 i 3 mg L⁻¹), karbonata (80 i 420 mg L⁻¹) i pH-vrijednosti (pH 5, 7 i 9) na brzinu fotolitičke razgradnje albendazola. Ispitana je kinetika razgradnje, određene su konstante brzine razgradnje tijekom prvih 15 minuta sunčanja uzoraka i vrijeme poluraspada albendazola. U svim eksperimentima koncentracija albendazola se smanjila na manje od 50 % početne vrijednosti unutar prvih 10 minuta od početka sunčanja.

Najveći utjecaj na smanjenje brzine fotolitičke razgradnje uočen je uz prisutnost HA koncentracije 10 mg L⁻¹, dok je najveće povećanje brzine uočeno uz koncentraciju HA 5 mg L⁻¹. Kod ispitivanja utjecaja pH-vrijednosti, pokazalo se da je vrijeme poluraspada najmanje pri pH-vrijednosti 7.

Najveće smanjenje koncentracije albendazola izmjereno je uz prisutnost HA u koncentraciji od 5 mg L⁻¹ pri čemu je koncentracija albendazola na kraju eksperimenta iznosila 9,87 % početne vrijednosti, dok je najmanje smanjenje koncentracije albendazola izmjereno u puferskoj otopini pH-vrijednosti 7, pri čemu je na kraju eksperimenta koncentracija albendazola iznosila 41,53 % početne vrijednosti.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je albendazol izrazito podložan izravnoj fotolizi. Unutar 10 minuta od početka sunčanja koncentracija se smanji na manje od 40 % početne vrijednosti. No, važno je napomenuti da niti u jednom eksperimentu nije postignuta potpuna razgradnja albendazola.

6. Literatura

- 1) M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, Kem. Ind. 65 (9-10) (2016) 471–482.
- 2) M. Raghav, S. Eden, K. Mitchell, B. Witte, Contaminants of emerging concern in water, Arroyo (2013) 1-12.
- 3) S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, Hrvatske vode, 24 (2016) 119-136.
- 4) A.J.M. Horvat, M. Petrović, S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, D. Ašperger, S. Pelko, A. D. Mance, M. Kaštelan-Macan, Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment, TrAC (2011) 4-9.
- 5) B.M. Peake, R. Braund, A.Y.C. Tong, L.A. Tremblay, The Life-Cycle of Pharmaceuticals in the environment, Elsevier, Amsterdam, 2016.
- 6) R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas, Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, Chemosphere 50 (2003) 1319–1330.
- 7) <http://www.hoya.hr/zanimljivost/sunce-i-uv-zracenje/73/> (pristupljeno 23.05.2017)
- 8) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/> (Pristupljeno 31.5. 2017.)
- 9) L. Holden-Dye, R. Walker, Anthelmintic drugs, u V. Maricq i S.L. McIntire (ur.) WormBook, The C. elegans Research Community, 2007, 1-13.
- 10) H. A. Shalaby, Anthelmintics resistance: How to overcome it?, Iran J. Parasitol, 8(1) (2013) 18–32.
- 11) http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2513&Itemid=2786 (Pristupljeno 13.5.2017.)
- 12) P. Lukáš, R. Podlipná, J. Lamka, T. Dědková, L. Skálová, I. Vokřál, L. Lecová, T. Vaněk, B. Szotáková, Albendazole in environment: faecal concentrations in lambs and impact on lower development stages of helminths and seed germination, Environ. Sci. Pollut. Res., 23(13) (2016) 13015-13022.
- 13) <https://chemicalize.com/#/calculation> (Pristupljeno 8.6.2017.)
- 14) M. J. Miller, Chromatography: Concepts & contrasts, John Wiley & Sons, New Jersey, 2009.
- 15) Š. Ukić, T. Bolanča, Ionska kromatografija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
- 16) https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_performance_liquid_chromatography (Pristupljeno 17.6.2017.)

- 17) M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina*, 45(3) (2009) 218-23.
- 18) <https://pt.slideshare.net/ShaimaaAhmadeen/1-14411077/7> (Pristupljeno 18.6.2017.)
- 19) http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016 (28.6.2017.)
- 20) http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0911.htm (Pristupljeno 18.6.2017.)
- 21) <https://www.khanacademy.org/science/chemistry/atomic-structure-and-properties/mass-spectrometry/a/isotopes-and-mass-spectrometry> (Pristupljeno 18.6.2017.)
- 22) D. J. Burinsky, Mass spectrometry, u S. Ahuja i N. Jespersen (ur.) *Modern instrumental analysis*, Elsevier, vol. 47, *Comprehensive analytical chemistry*, Springer, New York, 2006, str 319-396.
- 23) R. E. Ardrey, *Liquid chromatography–mass spectrometry: An introduction*, John Wiley & Sons, Chichester, (2003.), 33-105
- 24) M. Periša, Kromatografsko određivanje fotorazgradnih produkata farmaceutika u okolišu, disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
- 25) <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00518#properties> (Pristupljeno 27.6.2017.)
- 26) C.A. Weerasinghe, J.D. Lewis, J.M. Mathews, A.R. Jeffcoat, P.M. Troxler, R.Y. Wang, Aquatic photodegradation of albendazole and its major metabolites, 1. Photolysis rate and half-life for reactions in a tube, *J. Agric. Food Chem.*, 40(8) (1992) 1413-1418.
- 27) S.-L. Ding, X.-K. Wang, W.-Q. Jiang, X. Meng, R.-S. Zhao, C. Wang, X. Wang, Photodegradation of the antimicrobial triclocarban in aqueous systems under ultraviolet radiation, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 3195–3201.

Životopis

Rođen sam ■■■■■■■■ gdje sam 2010. završio Prirodoslovno matematičku gimnaziju. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije na studiju Ekoinženjerstvo upisujem u rujnu 2010. godine. Radio sam studentsku praksu u PLIVI, Sireli i Zagrebačkim otpadnim vodama. Preddiplomski studij završio sam 2015. obranom završnog rada pod temom „*Priprava i karakterizacija PLA kompozita s grafitnim punilima*“ uz mentorstvo izv. prof. dr. sc. Elvire Vidović. Diplomski studij nastavio sam na istom studiju. Od sredine 4. semestra diplomskog studija radim u Plivi.